



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS, ANÁLISIS
FITOQUÍMICO Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL
ÁRBOL DE 'FLOR DE MANITA'
(*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

P R E S E N T A:



CARIDAD RIVAS REYES



DIRECTOR
DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

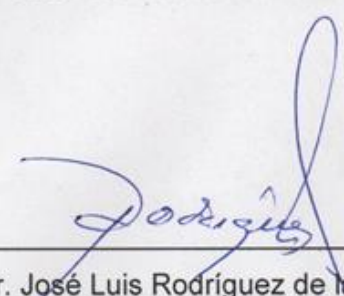
Chapingo, México, Mayo de 2016

*¿Con qué he de irme?
¿Nada dejaré en pos de mí sobre la tierra?
¿Cómo ha de actuar mi corazón?
¿Acaso en vano venimos a vivir,
a brotar sobre la tierra?
Dejemos al menos flores
Dejemos al menos cantos*

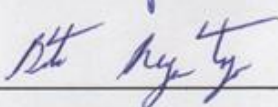
Nezahualcóyotl., Un recuerdo que dejo

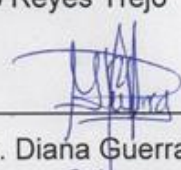
OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS, ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ÁRBOL DE 'FLOR DE MANITA' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de la M en C. Caridad Rivas Reyes autor de la presente tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura estuvo constituido por:

Presidente: 
Dr. José Luis Rodríguez de la O.

Asesor: 
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

Asesor: 
Dr. Benito Reyes Trejo

Lector externo: 
Dr. Diana Guerra Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico otorgado y sin el cual no habría podido cumplir con esta meta.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, al **Instituto de Horticultura** y a la **Coordinación del Posgrado** por permitirme ser parte de esta institución y brindarme todas las facilidades para realizar este trabajo.

Al Doctor **José Luis Rodríguez de la O**, por todo el apoyo brindado y paciencia en la dirección y desarrollo de este proyecto.

A los Doctores **Juan Porfirio Legaria Solano** y **Benito Reyes Trejo**, por sus valiosas aportaciones y tiempo, por su asesoría en el trabajo de laboratorio, por ser parte de este equipo de investigación y por compartir un poco de su conocimiento conmigo.

A la **Doctora Diana Guerra**, del **Laboratorio de Productos Naturales** de Preparatoria Agrícola por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y las observaciones derivadas de la misma, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por permitirme vivir, en el amplio significado de la palabra y permitirme seguir todos los días.

A mis padres quienes han sido mi luz, guía y apoyo incondicional.

A Mario, Ivonne Denise y Angel Adrian cuyo amor es el alimento diario de mi vida.

A mis hermanos Rodrigo Salvador y Daniel por estar ahí presentes apoyándome.

A mis compañeros de Doctorado, que me brindaron apoyo en muchos aspectos.

Muchas, muchas gracias....

DATOS BIOGRÁFICOS

Caridad Rivas Reyes nació en la Ciudad de México, sus estudios elementales los cursó en el Estado de México, en 1996 ingresó al Instituto Politécnico Nacional en donde cursó el nivel medio superior y superior, egresando como Ingeniero en Alimentos en el año 2003. Se desarrolló como profesionista en varias empresas y en el año 2008 se postuló para realizar estudios de maestría en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología de la misma institución, obteniendo el grado de Maestra en Ciencias en Bioprocesos en el año 2010. En el 2012 fue aceptada como alumna del Doctorado en Ciencias en Horticultura por la Universidad Autónoma Chapingo, hoy presenta esta tesis, derivada del trabajo de investigación realizado.

OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS, ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ÁRBOL DE 'FLOR DE MANITA' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

In vitro OBTAINING OF CALLUS, PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND GENETIC DIVERSITY OF THE HAND-FLOWER TREE (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

M en C. CARIDAD RIVAS REYES¹

DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O²

RESUMEN

El árbol de 'flor de manita' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.) es una especie que se encuentra en riesgo de extinción, las flores se han utilizado desde tiempos prehispánicos con fines medicinales. Los objetivos de este trabajo fueron mediante cromatografía en columna aislar y purificar metabolitos secundarios de esta especie, se encontró β -sitosterol en los extractos hexánico y de cloruro de metileno. Se evaluaron combinaciones de reguladores de crecimiento en el Medio Murashige y Skoog para producir callos *in vitro* a partir de explantes de estambres de la flor, los reguladores que produjeron mejor respuesta fueron 2-4 D ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y K ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), se comparó con cromatografía en capa delgada la presencia de β -sitosterol en los callos producidos *in vitro*. Utilizando marcadores moleculares ISSR (Inter-Seuencias Simples Repetidas) se evaluó la diversidad genética en tres poblaciones: Carrizal de Bravo en el Estado de Guerrero, Chapingo, San Miguel Tlaixpan y un árbol de Toluca en el Estado de México. La mayor diversidad genética detectable se encontró entre las poblaciones (57.55 %). La población de Guerrero mostró el mayor índice de diversidad genética de Nei ($H = 0.1597$). Las poblaciones se encuentran en proceso de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.57$).

PALABRAS CLAVE: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr, *in vitro*, β -sitosterol, ISSR.

Alumno¹
Director²

ABSTRACT

The hand-flower tree (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.) is a species that is at risk of extinction; its flowers have been used since pre-Hispanic times for medicinal purposes. The aims of this work were by column chromatography to isolate and purify secondary metabolites of this species; β -sitosterol was found in hexane and methylene chloride extracts. Combinations of growth regulators used in Murashige and Skoog medium to produce *in vitro* calli from flower stamen explants were evaluated; the regulators that produced the best response were 2-4 D ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and K ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The presence of β -sitosterol in calli produced *in vitro* was compared using thin layer chromatography. Genetic diversity in three populations (Carrizal de Bravo in the State of Guerrero, Chapingo, San Miguel Tlaixpan and a tree from Toluca in the State of Mexico) was evaluated using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) molecular markers. Most detectable genetic diversity is found among populations (57.55 %). The population of Guerrero showed the highest rate of Nei genetic diversity ($H = 0.1597$). The populations are in genetic differentiation ($G_{ST} = 0.57$).

KEYWORDS: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr, *in vitro*, β -sitosterol, ISSR.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DATOS BIOGRÁFICOS	iii
RESUMEN GENERAL/GENERAL ABSTRACT	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS GENERALES	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes históricos del árbol de ‘flor de manita’ (<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larr.)	3
1.2 Características del árbol de ‘flor de manita’	6
1.2.1 Descripción de la especie	6
1.2.2 Distribución	7
1.2.3 Nombres comunes	7
1.2.4 Clasificación botánica	7
1.2.5 Usos	8
1.2.6 Investigaciones realizadas	8
1.3 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	9
1.3.1 Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	10
1.4 Análisis Fitoquímico	14
1.4.1 Metabolitos secundarios	15
1.4.2 Importancia de los metabolitos secundarios en la industria farmacéutica	16
1.4.3 Aislamiento de los compuestos activos	17
1.5 Marcadores moleculares	18
1.5.1 Marcadores moleculares basados en PCR	19

1.5.1.1 ISRR (Inter Simple Sequence Repeats)	22
BIBLIOGRAFÍA	24
CAPITULO I. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS FLORES DE <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larr.	28
RESUMEN	28
ABSTRACT	29
INTRODUCCION	30
MATERIALES Y METODOS	32
RESULTADOS Y DISCUSION	33
CONCLUSIONES	37
AGRADECIMIENTOS	38
BIBLIOGRAFÍA	38
CAPITULO II. OBTENCIÓN <i>in vitro</i> DE CALLOS DEL ÁRBOL DE ‘FLOR DE MANITA’	41
RESUMEN	41
ABSTRACT	42
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	55
AGRADECIMIENTOS	56
BIBLIOGRAFÍA	56
CAPITULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ÁRBOL DE ‘FLOR DE MANITA’	60
RESUMEN	60
ABSTRACT	61
INTRODUCCIÓN	62
MATERIALES Y MÉTODOS	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	75
AGRADECIMIENTOS	75
BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1 Principales compuestos aislados de la 'flor de manita'	8
1.1 Actividades farmacológicas del β -sitosterol	36
2.1 Diseño experimental	47
2.2 Efecto de los diferentes tratamientos para controlar la contaminación	49
2.3 Efecto de los diferentes tratamientos para controlar la oxidación	49
2.4 ANOVA del efecto de los tratamientos en la formación de callos	50
2.5 Comparación de medias	50
2.6 Evaluación de peso fresco de callo	54
3.1 Poblaciones analizadas del árbol de 'flor de manita'	65
3.2 Iniciadores ISSR utilizados	69
3.3 Diversidad genética dentro de las poblaciones	73
3.4 Diversidad genética entre las poblaciones	74
3.5 Medidas de identidad	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 Árbol histórico de la Ciudad de Toluca	4
2 Árbol de la localidad de San Miguel Tlaixpan, Estado de México	5
3 Bosque mesófilo de montaña en Leonardo Bravo, Guerrero	5
4 Hojas, flor y fruto del árbol	7
5 Regeneración directa e indirecta en cultivo <i>in vitro</i>	10
6 Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios	16
7 Métodos para obtener sustancias activas de plantas	17
8 Síntesis enzimática de ADN: el método PCR	20
9 Ciclo de la reacción en cadena de la ADN polimerasa	21
10 Alineamiento de los iniciadores ISSR no anclados	23
11 Alineamiento de los iniciadores ISSR anclados	24
1.1 Espectro de ¹ H-RMN de β-sitosterol aislado de los extractos de la flor	34
1.2 Cromatografía en capa delgada de los componentes aislados	35
1.3 Estructura de β-sitosterol	35
1.4 Espectro de ¹ H-RMN de sacarosa aislada del extracto metanólico	37
2.1 Regiones de la flor cultivadas <i>in vitro</i>	47
2.2 Aspecto físico del explante utilizado y callos generados	53
2.3 Crecimiento de los callos evaluados	54
2.4 Comparación de los extractos de callos respecto al β-sitosterol	55
3.1 Patrones de bandas obtenidas con el iniciador ISSR 5	68
3.2 Dendrograma de relaciones entre las poblaciones	70
3.3 Dendrograma de relaciones entre individuos	71

INTRODUCCIÓN

El árbol de las manitas, *Chiranthodendron pentadactylon*, tiene una flor cuyos estambres rojos terminados en forma de uña recuerdan los dedos de una mano. (Fernández Pérez *et al.*, 2008). Crece en los bosques mesófilos de montaña y en los mixtos de pino y encino de los estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla, Chiapas y de Guatemala. Tradicionalmente, esta vistosa flor se consume en infusiones para tratar úlceras crónicas, inflamación de los ojos, dolor de dientes, hemorroides o para controlar la presión, pero sobre todo para afecciones del corazón, epilepsia, insomnio y como tranquilizante del sistema nervioso (Chanfón Kung, 2007). Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas. Aproximadamente 1 600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica. Esto hace que el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un enorme reto, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación. Es comprensible entonces el interés de grandes industrias en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción.

Chiranthodendron pentadactylon, está catalogada como una especie en riesgo de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 y en la lista roja de los árboles del “bosque de niebla mexicano” publicación internacional de los recursos forestales en peligro de desaparecer (González-Espinosa *et al.*, 2011). Razones por las cuales se hace necesario realizar estudios interdisciplinarios con la finalidad de preservar los recursos naturales de nuestro país. En los últimos años, la protección de la diversidad genética se ha establecido como un objetivo prioritario en los planes de conservación. Se trata, a largo plazo, de mantener la viabilidad evolutiva de las especies y para ello maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno cambiante. Por ello son de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicos y/o centros de variabilidad genética para conservar especies amenazadas.

La conservación de recursos genéticos forestales se beneficia fundamentalmente de los desarrollos en los ámbitos de los marcadores morfológicos y moleculares, como medio para conocer la amplitud y la distribución de la variabilidad genética a conservar (Toribio y Celestino, 2000). Es en este contexto, donde los avances de la biotecnología vegetal, especialmente el cultivo *in vitro* de células y tejidos constituyen una alternativa para el rescate, la multiplicación de plantas así como para el estudio de la síntesis y producción de metabolitos secundarios de plantas de gran interés (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

JUSTIFICACIÓN

México cuenta con una gran diversidad biológica sin embargo muchas especies vegetales, entre ellas *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. se encuentran en peligro de extinción. De acuerdo con estudios etnobotánicos, de distribución geográfica y de variabilidad genética, “la flor de manita” es una especie que se encuentra amenazada, por lo tanto, en este trabajo se plantea como alternativa el uso callos de la flor de manita obtenidos *in vitro* en lugar de las flores que se usan en la medicina tradicional.

HIPÓTESIS

La regulación de las respuestas morfogénicas a la formación de callos de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. es dependiente de la concentración de auxinas y citocininas.

Los extractos de callos, obtenidos *in vitro*, de las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., contienen metabolitos secundarios presentes en las flores de esta especie.

La diversidad genética dentro de las poblaciones de *Chiranthodendron pentadactylon* es baja debido a su difícil propagación y/o los factores ambientales.

OBJETIVOS GENERALES

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la obtención de callos a partir de estructuras de la flor de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. y en las células cultivadas identificar y determinar los principales componentes fitoquímicos o metabolitos secundarios de las mismas, así como evaluar la diversidad genética de diferentes poblaciones mediante el uso de marcadores genéticos moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar tipos y niveles de reguladores del crecimiento en la respuesta para la obtención *in vitro* de callos a partir de la flor de *C. pentadactylon*.
2. Aislar, purificar y elucidar la estructura química de los metabolitos secundarios en flores de *C. pentadactylon* y callos propagados *in vitro* de esta especie para determinar si contienen los mismos componentes fitoquímicos.
3. Evaluar la variabilidad genética presente en tres poblaciones de *C. pentadactylon*, con marcadores moleculares ISSR.

1. MARCO TEÓRICO

1. Antecedentes históricos del árbol de ‘flor de manita’ (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

Existen amplias referencias de la importancia de los Jardines Botánicos en el México prehispánico. Francisco del Paso menciona que los señores Toltecas legaron sus conocimientos sobre las plantas medicinales a los Mexicas y compartieron su admiración por las plantas con los Tarascos y Zapotecas. Esos grupos eran amantes de los bosques y las huertas frescas, donde se cultivaban un sinnúmero de plantas, principalmente árboles, para obtener sus flores de aroma deliciosos (Santaella-Quintas, 2010).

Francisco Hernández, el protomédico del rey Felipe II habiendo oído de la grandeza de esos jardines los visitó para conocer las especies que ahí existían. En su obra hace mención a su estadía en Huaxtepec entre 1570 y 1577, para conocer dos valiosos medicinales: el bálsamo de indias y el Macpalxóchitl, conocida como ‘flor de manita’, por su apariencia. Fue reconocida en 1787 en el cerro de Huitzila, junto a la cabecera municipal de Toluca (Figura 1), por José Mariano Mociño Suárez Lozada, quien formó parte de la expedición científica de Martín Sessé por toda Nueva España. Los habitantes de Toluca les dijeron su nombre en náhuatl, *macpalxochitl cuahuatl*, y ellos lo tradujeron al griego, llamándolo *Chiranthodendron*. Posteriormente en 1803, Alejandro von Humboldt y Aimé Bonpland conocieron la especie en una excursión de tres días por el valle de Toluca, e intentaron propagarla por semilla en Europa, pero no lo consiguieron. Sin embargo en la actualidad muy pocos de esos jardines han sobrevivido al paso inclemente del tiempo, después de la conquista muchos de ellos se fueron perdiendo. Un ejemplo que todavía podemos admirar son los corpulentos árboles de ‘flor de manita’ que se encuentran en las inmediaciones del cerro del Tezcutzingo, en San Miguel Tlaixpan, Estado de México (Figura 2) en el caso de esta especie son descendientes de los originales mencionados en las crónicas (Santaella-Quintas, 2010).

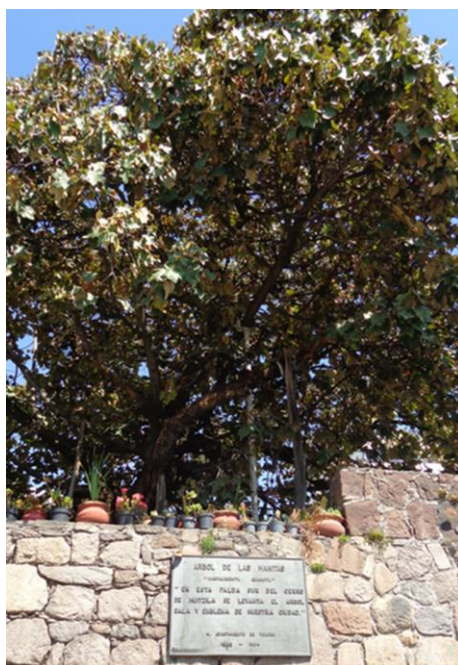


Figura 1. Árbol histórico de la Ciudad de Toluca.



Figura 2. Árbol de la localidad de San Miguel Tlaixpan, Estado de México.

En el municipio de Leonardo Bravo, Guerrero, existe un mosaico importante de bosque mesófilo de montaña (Figura 3), con alta biodiversidad y compleja estructura, donde se explota comercialmente la ‘flor de manita’. Las flores son colectadas de diciembre a mayo, principalmente por niños y mujeres, para contribuir al ingreso familiar. Su venta tiene como destino el Mercado de Sonora, en la Ciudad de México (Santaella-Quintas, 2010).

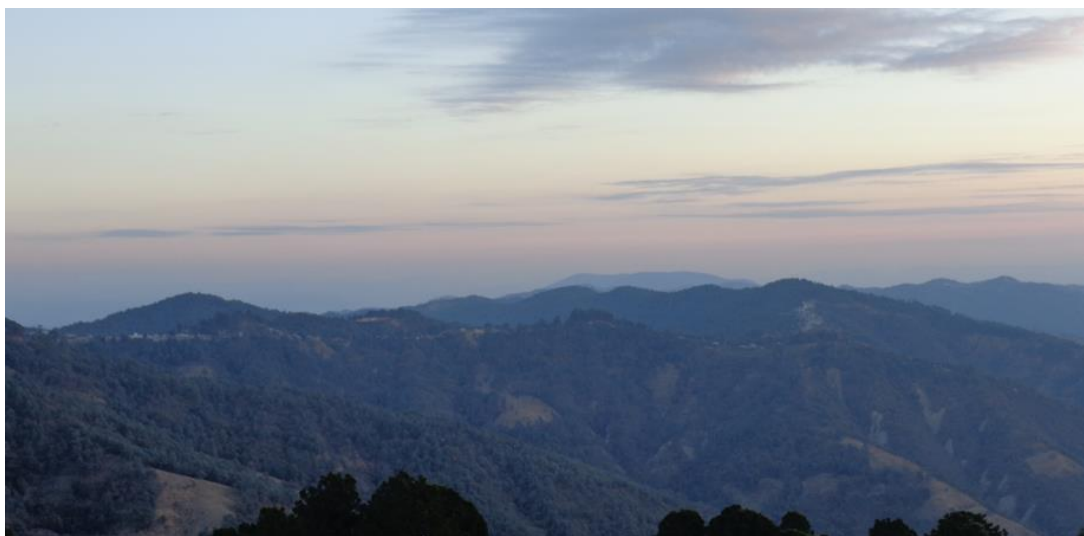


Figura 3. Bosque Mesófilo de Montaña en Leonardo de Bravo, Guerrero.

2. Características del árbol de ‘flor de manita’

1.2.1 Descripción de la especie

Son árboles de 10 y hasta 30 metros de altura; de madera frágil; las ramas, especialmente cerca de las hojas están revestidas de tomento compuesto de tricomas estrellados, que en conjunto presentan un color ferruginoso; la corteza del tronco es lisa y de color café.

Las hojas son anchas y ovadas, con tres a cinco lóbulos profundos o superficiales, palmatinervados, su base es notoriamente cordada, el ápice agudo o acuminado, son ligeramente crenadas, envés ferrugíneo y haz casi glabro; tienen peciolo de 6 a 8 cm y están provistas de pequeñas estípulas foliáceas, caedizas o persistentes. Dichas hojas son verdes y están cubiertas especialmente las jóvenes, de tomento en ambas caras; las adultas lo llevan solamente en la cara inferior (Figura 4). Las flores son hermafroditas y zigomórficas, solitarias, axilares; los pedúnculos son opuestos a las hojas, con tres bractéolas; caliz campanulado, cinco lóbulos lanceolados de color rojo en el interior tomentoso café rojizo en el exterior, imbricados, connados, apétalas; los estambres son exertos, se presentan en número de cinco, están unidos por la base formando un tubo cilíndrico que se ensancha hacia abajo por donde se une con el perianto; son de color rojo brillante y se extienden en la parte superior, arqueándose ligeramente hacia adentro, dando el aspecto de una mano; anteras largas, con dos tecas y dehiscencia longitudinal; el polen tiene forma triédrica y es de color amarillo; el ovario se encuentra escondido en la base del tubo estaminal, sincárpico, cinco carpelos con óvulos numerosos en cada lóculo; el estilo asciende en medio del mismo tubo y deja salir una pequeña punta amarillenta formada por cinco surcos que forman el estigma. El fruto es una cápsula leñosa pentavalvada, profundamente acanalado y mide unos 12 cm es dehiscente de la parte media hacia el extremo superior; las semillas son ovoides y de color negro, brillantes miden 5 mm de largo por 3 mm de ancho, con una carúncula granulosa de color amarillo a naranja, endospermo carnosos y cotiledón circular plano (Zarate-Rodríguez, 2002).



Figura 4. En la parte superior hoja (haz y envés), abajo izquierda flor y derecha fruto del árbol de flor de manita.

1.2.2 Distribución

Se distribuye en México de manera silvestre en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas: se encuentra a altitudes de 1450 a 2680 m.s.n.m en bosques de pino-encino y bosque mesófilo de montaña; de manera cultivada en el Estado de México. Además de México se reporta distribuida en Guatemala (Osuna-Fernández, 1997 y Zarate-Rodríguez, 2002).

1.2.3 Nombres comunes

A *Chiranthodendron pentadactylon* Larr se le conoce como “caneque”, “palo de yaco”, “flor de tulia”, “flor de manita”, “mano de perdiz”, “macpalxóchitl” o “mano de león” (Osuna-Fernández, 1997).

1.2.4 Clasificación botánica de Scagel et al. 1977

Reino: Vegetal
División: Antophyta
Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotiledonea
Orden: Malvales
Familia: Sterculiaceae

Tomada de Vásquez (1998)

Género: *Chiranthodendron*
Especie: *pentadactylon*

1.2.5 Usos

Tradicionalmente, esta vistosa flor se consume en infusiones para tratar úlceras crónicas, inflamación de los ojos, dolor de dientes, hemorroides o para controlar la presión arterial, pero sobre todo para afecciones del corazón, epilepsia, insomnio y como tranquilizante del sistema nervioso (Chanfón Kung, 2007).

1.2.6 Investigaciones realizadas

A pesar de que el árbol de ‘flor de manita’ se menciona en muchos libros y es el símbolo de la Sociedad Botánica de México, aún no se han realizado suficientes estudios para determinar el tipo de sustancias curativas que contiene (Chanfón Kung, 2007). Los principales estudios realizados se muestran en el Cuadro 1 en el cual Lara y Márquez (1996) hicieron una recopilación de los principales compuestos aislados.

Cuadro 1. Principales compuestos aislados de la flor de manita

Compuestos	Tipo de compuesto
Octacoseno	Alqueno
Éster Alifático	Éster
Docosanol β -1	Alcohol
Glucosa	Carbohidrato
Sacarosa	Carbohidrato
β -Sitoesterol	Esterol, flavonoide rojo
3-glucósido de cianidina	Glucósido (flavonoide)
Leucocianidina	Flavonoide
7-glucósido de luteolina	Glucósido
7-glucorónido de luteolina	Glucorónido
3-glucósido de quercetina	Glucósido
Gosipetina	Glucorónido
3-glucorónido de gosipetina	Glucorónido
Ácido gálico	Ácido fenólico
Triglucósido de apigenidina	Glucósido antocianina

En los últimos años, el cambio de uso del suelo para la introducción de la ganadería y agricultura ha ocasionado la destrucción de los hábitats naturales del árbol de ‘flor de manita’, dando como resultado que las poblaciones de estos árboles disminuyan al punto de tener catalogada a esta especie como amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2001). Por lo cual se debe trabajar de manera interdisciplinaria para lograr rescatar, caracterizar y conservar esta especie.

1.3. Cultivo *in vitro* de células y de tejidos vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencia celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo (Zhao *et al.*, 2005). El empleo de procedimientos de cultivo *in vitro* ha permitido crecer células, tejidos y órganos provenientes de las plantas en condiciones controladas de laboratorio. Estos cultivos integran un conjunto de metodologías especializadas usadas para cultivar el material vegetal en forma estéril con medios nutritivos sólidos o líquidos, a los que se les adicionan reguladores de crecimiento vegetal. Utilizando estos cultivos, se ha logrado producir de manera homogénea y controlada algunos compuestos de alto valor agregado que habitualmente se encuentran en la planta de origen. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ofrecer muchas ventajas para la producción de los compuestos activos, entre las que se pueden mencionar las siguientes: 1) un suplemento continuo de compuestos en forma óptima y bajo condiciones controladas; 2) la independencia de factores climáticos y de plagas presentes en plantas silvestres; 3) la propagación de especies con crecimiento muy lento o que se encuentran en peligro de extinción; y 4) la acumulación de compuestos que no se han podido identificar en la planta de origen. Por otro lado, y al ser los cultivos *in vitro* sistemas altamente controlados, éstos pueden constituir modelos adecuados para realizar investigaciones bioquímicas y fisiológicas que ayuden a entender el metabolismo secundario de las plantas; así como a investigar aspectos básicos sobre sus mecanismos de especialización o diferenciación (Villarreal *et al.*, 2014).

1.3.1 Condiciones del cultivo *in vitro*

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones (Figura 5). Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

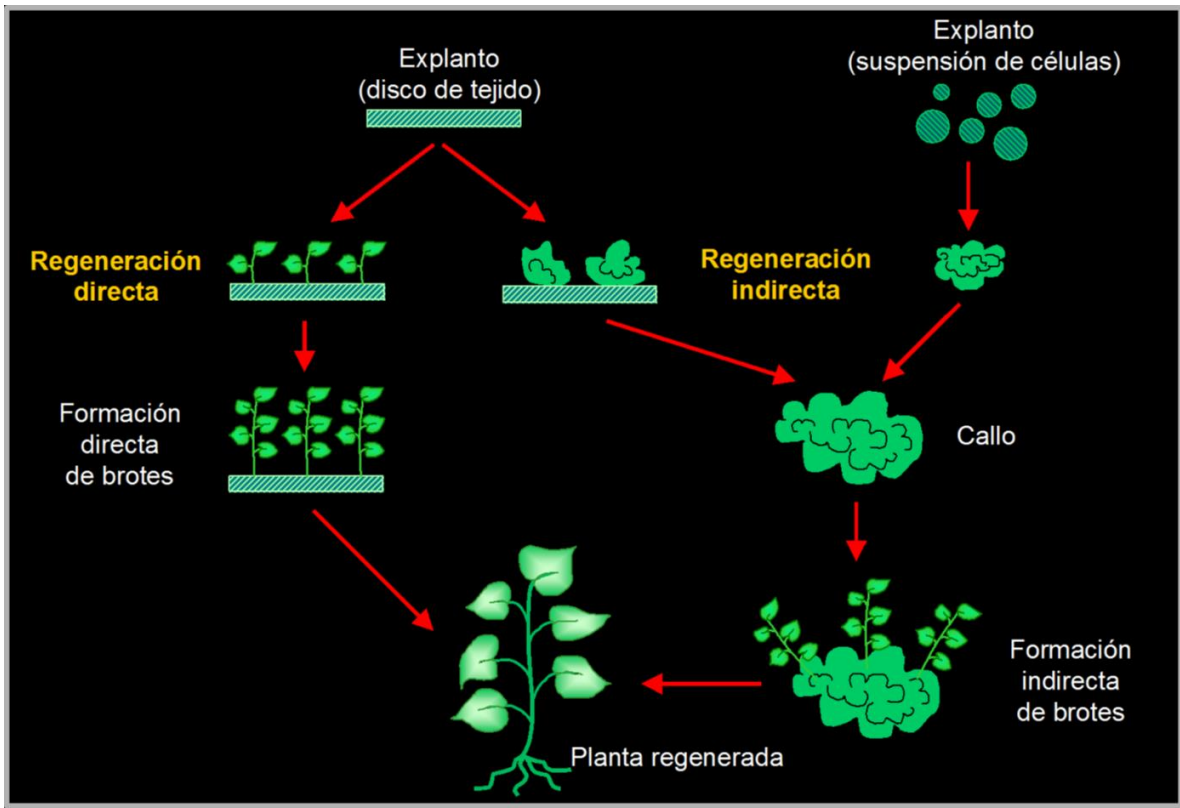


Figura 5. Regeneración directa e indirecta en Cultivo *in vitro*.

La morfogénesis, se define como el origen y los cambios en la forma específica (estructura y organización) durante el desarrollo de un organismo, esto puede ocurrir en la organogénesis o en la embriogénesis somática y dependen tanto de la naturaleza del

explante como del genotipo. La organogénesis consiste en la formación de novo de órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantes cultivados *in vitro*. La embriogénesis somática, en tanto, es la capacidad de ciertas células vegetales para formar embriones, estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial. Los tejidos juveniles presentan frecuentemente una mayor aptitud para la organogénesis adventicia que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes. Esta aptitud está ampliamente aprovechada en la multiplicación vegetativa *in vitro*, sobre todo en los casos de especies difíciles de propagar, especialmente, las leñosas (Marinucci *et al.*, 2004).

La inducción de la formación de un callo en condiciones controladas es una etapa crucial, ya que implica la reprogramación de las células que pertenecen a un tejido diferenciado para regresar a un estado desdiferenciado y con alta capacidad proliferativa. Después de la desdiferenciación, las células se empiezan a dividir rápidamente bajo la influencia de reguladores de crecimiento, lo que da lugar al callo (Mireles-Ordaz *et al.*, 2015).

Los callos son agregados de células proliferantes no especializadas que crecen en medios semisólidos en presencia de carbohidratos, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, y que son suplementados con reguladores de crecimiento vegetal del grupo de las auxinas y las citocininas. Estas últimas son las responsables de mantener el crecimiento no diferenciado. Los callos crecen bajo condiciones estériles y usualmente se inducen a partir de tejidos jóvenes de la planta. En teoría es posible obtener callos de todas las especies vegetales; sin embargo, las condiciones óptimas para su crecimiento dependen de cada especie y requieren ser determinadas. Los callos pueden variar en su textura, desde duros y compactos a tejidos friables. Los tejidos callosos constituyen el material primario que permitirá establecer cultivos de células en suspensión (Villarreal *et al.*, 2014).

Los primeros medios utilizados en cultivo de células y tejidos vegetales fueron semisintéticos. Frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua

de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios son de composición conocida, estando constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan. Las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el molibdeno para la nitrato reductasa y el magnesio para algunas cinasas (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

Los reguladores del crecimiento son de los compuestos más importantes que se incluyen en un medio de cultivo. Del propósito del medio de cultivo que se está preparando depende el tipo y la dosis que se utilizará. Se dividen en auxinas, citocininas, giberelinas y retardantes e inhibidores del crecimiento. Son naturales (hormonas) o sintéticas (reguladores de crecimiento).

1. Auxinas: Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con citocininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento. Se transportan polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinales y radicales). Junto con las citocininas, son esenciales para la viabilidad de las plantas. Su estructura química es muy variable, pueden acumularse en formas inactivas conjugadas a oligosacáridos y aminoácidos.

Auxinas naturales: El ácido indolacético (AIA) es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido ya que en las plantas se encuentran las enzimas oxidasas de la que hidrolizan a la hormona de manera que su efecto es suave y de poca duración.

Auxinas sintetizadas químicamente: Son auxinas sintéticas, el ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2, 4-D) y ácido indolbutírico (AIB). Resultan esenciales para el cultivo de meristemas, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción de embriogénesis somática, en el enraizamiento de microesquejes y actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinare.

La cantidad de auxina adicionada dependerá de los niveles endógenos (presentes naturalmente) en el material vegetal. Para el cultivo de callos se usan de 0.1 a 5.0 mg·L⁻¹ de AIA mientras que para la diferenciación de órganos se ha señalado a menudo que es necesario reducir la concentración de la auxina. El AIA o el ANA resultan mejores que el 2,4-D para la inducción de la organización celular. Si se usa 2,4-D en muchas especies de plantas tenderán a la formación de callos, por lo que si se desea inducir la organogénesis, se necesita cambiar el 2,4-D por otra auxina como el AIA o bien bajar su concentración.

2. Citocininas: Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. A altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical. Por otra parte, las citocininas permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas. Sin embargo, aunque algunos tipos de tejidos requieren esencialmente citocininas para el fenómeno de la organogénesis, éstas no son esenciales.

Dentro de las citocininas naturales se encuentra la Zeatina, que se extrae del endospermo del maíz, y 2 isopentanil adenina (2iP), aislada de *Clostridium tumerfaciens*, ésta produce un sobre crecimiento de los tejidos.

Citocininas sintéticas son: 6-benciladenina (6 BA) o también conocida como bencilanimopurina (6 BAP); la kinetina (KIN) también conocida como 6-furfurylaminopurina (FAP). La kinetina fue la primera citocinina identificada producida de síntesis por la degradación térmica del ADN. La 6-benciladenina se utiliza en concentraciones de 1.01-1.0 mg·L⁻¹.

3. Giberelinas: Se encuentran naturalmente en las plantas y produce un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos y el crecimiento meristemático. También inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. En general, inhiben la formación de tallos y raíces adventicias. De todas las giberelinas, es el ácido giberélico (AG3) el más utilizado en propagación *in vitro*.
4. Brasinoesteroides (BR): Los brasinoesteroides más ampliamente distribuidos en las plantas son los que poseen 28 átomos de carbono (C28), grupo en que la brasinólida es el representante más activo. Los estudios realizados con los BR han demostrado sus efectos múltiples en la elongación de los tallos, la actividad en la fotomorfogénesis, la inhibición del crecimiento de la raíz, la senescencia, la división celular, la inducción de la biosíntesis del etileno, el desarrollo vascular y reproductivo, el crecimiento del tubo polínico, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo, la modulación del estrés, entre otros.
5. Etileno: es un gas producido naturalmente por las plantas que afecta el crecimiento del cultivo.
6. Ancyridol: es un retardante del crecimiento, de efectos similares a las citocininas (Boeri, 2015).

1.4. Análisis fitoquímico.

Desde el inicio de su existencia el hombre ha buscado en la flora de su entorno plantas que le ayuden a tratar sus problemas de salud. En tiempos antiguos el reino vegetal representó la principal fuente para la obtención de medicamentos y una variedad de plantas fue utilizada en forma empírica para el tratamiento de diversas enfermedades. A través de los años, y con la ayuda de la investigación científica, ha sido posible validar experimentalmente los beneficios curativos de muchas plantas mediante protocolos de investigación. Por otro lado, el uso de procedimientos químicos ha permitido aislar y purificar compuestos valiosos de las plantas que se emplean para

tratar diversas enfermedades, lo que ha contribuido a mejorar sustancialmente la calidad de vida del hombre (Villarreal *et al.*, 2014).

1.4.1 Metabolitos secundarios

En general, las plantas suelen tener una cantidad considerable de compuestos que siempre han originado confusión acerca de la bioquímica y fisiología de las plantas, debido a su imposibilidad de huir frente a agresiones. A estos compuestos se les ha denominado metabolitos secundarios (Oyama, 1989).

Los productos naturales que se originan en las plantas se sintetizan a través de múltiples rutas metabólicas y se dividen en metabolitos primarios y secundarios, siendo estos últimos los más importantes en lo referente a aplicaciones. Los metabolitos primarios se consideran esenciales y son moléculas nutricionales o estructurales; dentro de este grupo se encuentran los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos. A partir de vías laterales a la fotosíntesis (Figura 6), las plantas producen los metabolitos secundarios, los cuales tienen funciones no nutricionales, pero muy importantes para su supervivencia. Entre los compuestos útiles para protegerse de los factores externos están los flavonoides, taninos, lignanos, cumarinas, alcaloides, terpenos, saponinas, entre otros. Los metabolitos secundarios son almacenados en varios organelos de las células vegetales, debido a la toxicidad que representa su acumulación. Basado en su origen biosintético, los metabolitos secundarios provenientes de plantas, se dividen en tres grandes grupos: los alcaloides, los pertenecientes a los derivados fenólicos (fenilpropanoides) y los terpenoides. Los alcaloides son aproximadamente 12,000 compuestos que se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos. De los compuestos fenólicos derivados de la vía del ácido shiquímico o de la vía malonato/acetato se reportan más de 8,000 moléculas, y se cuentan más de 25,000 terpenoides derivados del difosfato de isopentenilo (Leyva *et al.*, 2011).

1.4.3 Aislamiento de los compuestos activos

Cuando la composición química en una planta se desconoce, la extracción se realiza en base al uso que se le da en la medicina tradicional. Se hacen una serie de extracciones con diferentes disolventes de polaridad creciente (Rates, 2000). El uso de los diferentes disolventes es para separar los compuestos con características de polaridad similar a la de los disolventes. Los principios activos deben pasar de la planta al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad del disolvente (Kuklinsky, 2000).

Para obtener los compuestos activos aislados, en primer lugar, los extractos se analizan cualitativamente usando CCD (Cromatografía en capa delgada) para tener una evaluación general de su actividad biológica. Para su purificación los extractos seleccionados se someten a un fraccionamiento, cada fracción o compuesto puro es sometido a bioensayos y evaluación en animales (Figura 7). Esta metodología es conocida como bioactividad guiada por fraccionamiento. Después de determinar la pureza de los compuestos aislados, la estructura se determina por espectroscopía de infra-rojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear y por espectrometría de masas (Rates, 2000).

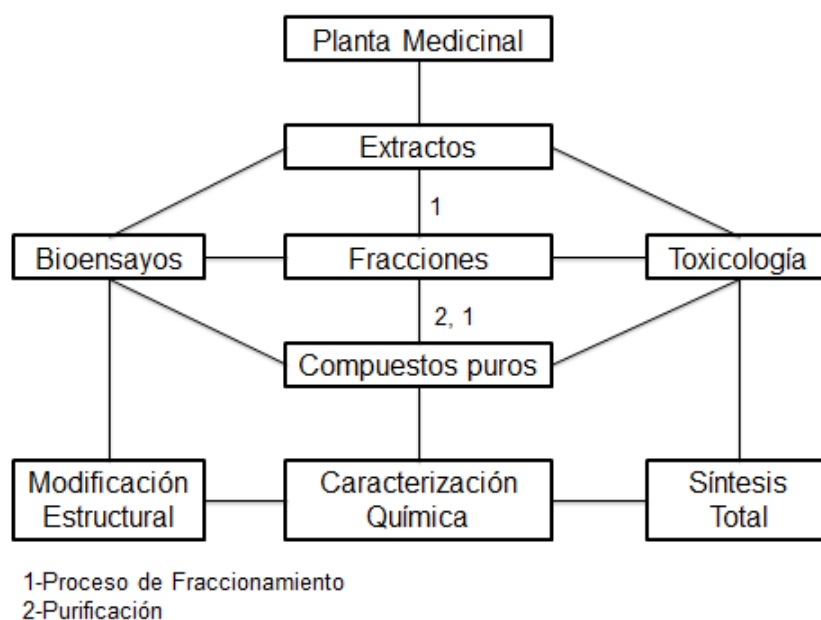


Figura 7. Métodos para obtener sustancias activas de plantas (Rates, 2000).

1.5. Marcadores moleculares.

El conocimiento de la variabilidad genética de las plantas de uso medicinal, al igual que las plantas utilizadas con otros fines, permitirá realizar un mejor aprovechamiento de los recursos fitogenéticos y observar su impacto en los factores que influyen en la productividad de los metabolitos (Lara *et al.*, 2003).

Los marcadores moleculares basados en ADN se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que puede localizarse en una región codificante o no codificante, y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos y que idealmente son representativos a nivel del genoma completo. Para su aplicación, el ADN extraído es digerido por enzimas específicas, o bien, se amplifican utilizando primers definidos, o combinando ambos procedimientos. Los resultados son visualizados como patrones de bandas en un gel (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

Hoy en día representan una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, existiendo diferentes técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta (Eguiarte *et al.* 2007).

Las propiedades que generalmente deben cubrir dichos marcadores son las siguientes: moderado o altamente polimórfico, de herencia codominante (es decir que nos permita discriminar de homo y heterocigotos en organismos diploides), asignación inequívoca de alelos, ocurrencia frecuente dentro del genoma, distribución en todas partes del genoma, comportamiento selectivamente neutral, acceso fácil, ensayos fáciles y rápidos, alta reproducibilidad, fácil intercambio de datos entre laboratorios, bajo costo tanto para el desarrollo de los marcadores como para los ensayos (Weising *et al.* 2005).

Las técnicas basadas en marcadores moleculares de ADN incluyen tres categorías básicas. Categoría 1: métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por ejemplo, RFLP y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs). Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores (primer) arbitrarios o

semiarbitrarios por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO. Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico” por ejemplo, SSR, Intersecuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías 2 y 3 son marcadores basados en la PCR.

1.5.1 Marcadores moleculares basados en PCR

La técnica PCR está basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados primers (también conocidos como iniciadores o cebadores). Este proceso es realizado por una enzima ADN polimerasa termoestable (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

La enzima ADN polimerasa que se utiliza por las células para la síntesis del ADN, es el elemento fundamental que sustenta la metodología de la “reacción en cadena de polimerasa” o PCR (por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica, es posible sintetizar, en pocas horas, millones de copias de un gen o de una región específica de ADN, a partir de cualquier genoma. Para lograr este propósito, el ADN que se desea amplificar o copiar extensivamente, es **desnaturalizado** —separar a sus dos hélices— utilizando calor como primer paso (Figura 8). Posteriormente, a cada una de las dos hebras del ADN desnaturalizado, se les asocia por **hibridación**, un fragmento de ADN sintético de hélice sencilla. Esta región de doble hélice que se forma en ambas hélices sirve ahora como sustrato o “primer” para que la ADN polimerasa sintetice, de manera análoga a como lo hace *in vivo*, copias nuevas de las dos hebras de ADN, teniendo como molde las hebras originales. De esta forma, y como resultado de un primer ciclo de amplificación, se obtienen dos dobles hélices idénticas a partir de una doble hélice (Figura 8). La sección I de la figura 8 muestra el segmento de ADN de doble cadena que se desea amplificar. Como se observa en la sección II, al calentar el ADN, las dos hélices se separan y, al agregar los primers específicos de 13 nucleótidos (fragmentos sintéticos de hélice sencilla de DNA señalados en rojo), se hibridan específicamente a sus secuencias complementarias en los extremos 3' de cada secuencia blanco. En la sección III se observa cómo la enzima DNA polimerasa utiliza

estos primers para comenzar la síntesis de nuevas cadenas complementarias utilizando el DNA como templado, siempre en la dirección 5' a 3'.

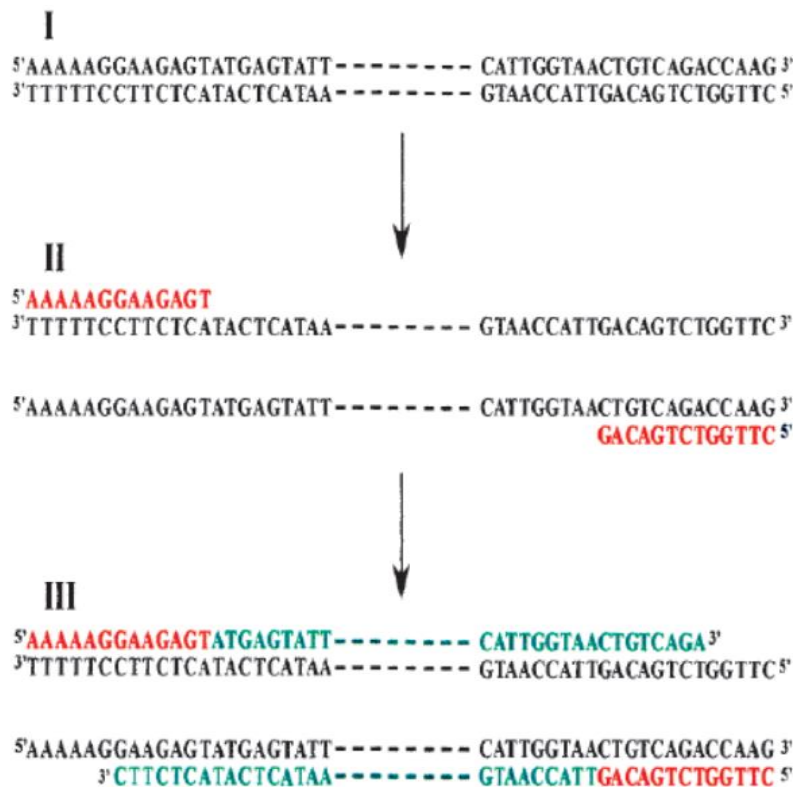


Figura 8. Síntesis enzimática de ADN utilizando ADN polimerasa y oligonucleótidos sintéticos como iniciadores: el método PCR.

Para lograr una verdadera **amplificación**, la reacción se somete a varios ciclos alternos de calentamiento y enfriamiento para permitir el funcionamiento de la enzima de manera que el iniciador o primer sea utilizado para sintetizar cadenas nuevas de ADN de manera exponencial (Figura 9). La enzima ADN polimerasa obtenida de un microorganismo termorresistente, *Thermos aquaticus*, es una enzima que no se desnaturaliza por calor y que trabaja a altas temperaturas (72 °C). Esta propiedad permite desnaturalizar el ADN de interés para ser polimerizado sin destruir la enzima, y así se puede multiplicar rápidamente el número de copias de un fragmento específico de ADN. Es posible aislar y amplificar genes específicos, si se tiene la secuencia de un fragmento de ADN del propio gen o de una sección del ADN cercana al gen de interés —sin tener que clonar el gen— utilizando esta técnica de PCR (Bolívar-Zapata, 2007).

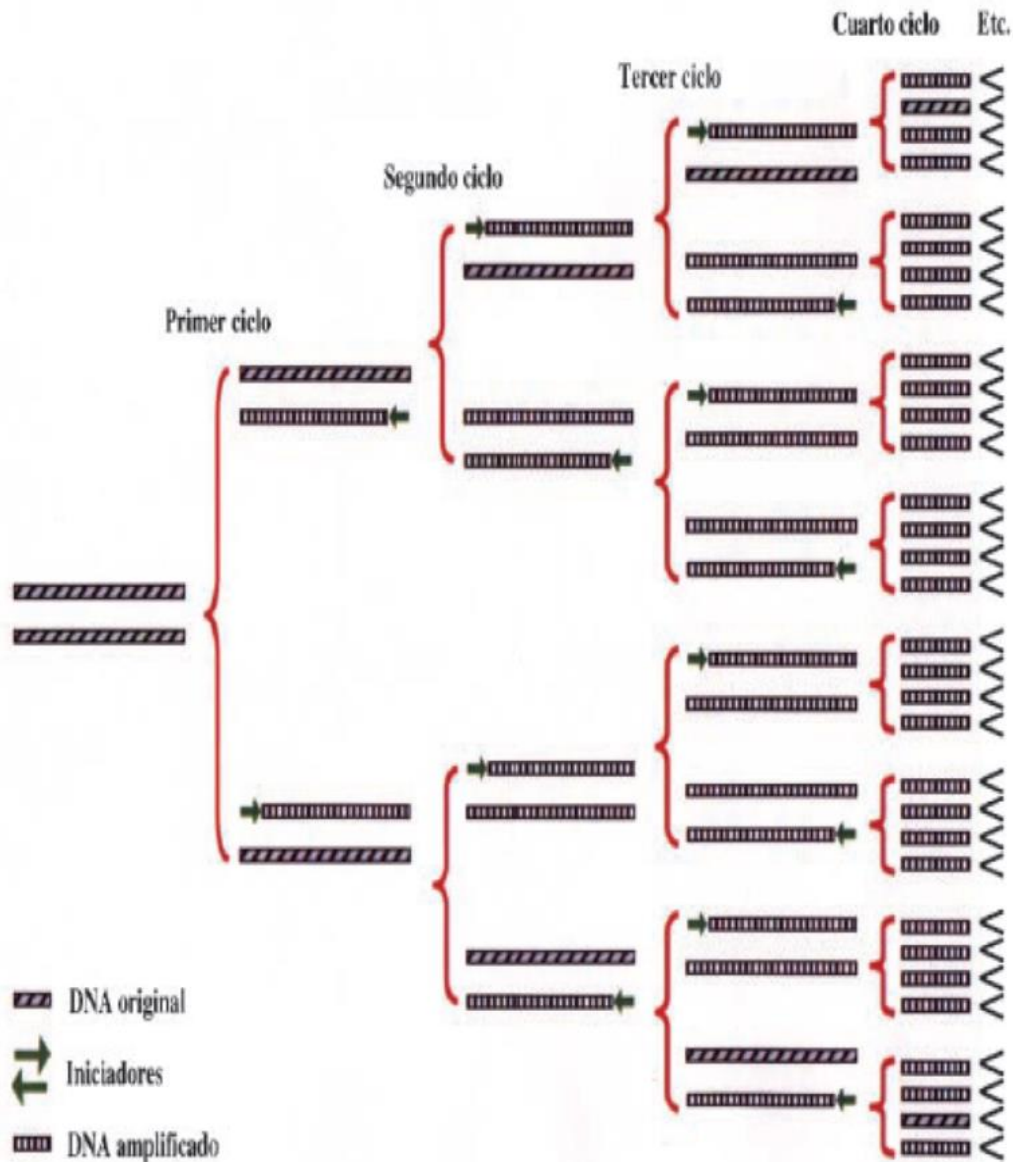


Figura 9. Ciclo de la reacción en cadena de la ADN polimerasa.

Para determinar los niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos, se puede utilizar varios métodos de caracterización. Los marcadores moleculares ISSR (Simple Sequence Repeats, en inglés), conocidos también como SSR, STR o microsatélites (Vogel y Scolnik 1997), presentan ventajas comparativas respecto a métodos tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms, en inglés). Para su obtención no se requiere de un

conocimiento previo de la secuencia del ADN en estudio; no utiliza sondas radioactivas; es relativamente rápido; emplea bajas cantidades de ADN y generan numerosos polimorfismos distinguibles (Lara *et al.*, 2003).

1.5.1.1 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

Son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) o (CA), ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos llamados también SSR's (simple sequence repeats) pueden ser -penta, -tetra, -tri o dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis, la ADN polimerasa puede "tartamudear" hacia delante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Eguiarte *et al.*, 2007).

Los primers de ISSR's consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos complementario a la secuencia microsatélite. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Eguiarte *et al.*, 2007).

Son dos las clases de iniciadores ISSR: no anclados y anclados. Los primeros poseen secuencia complementaria al microsatélite pero no poseen nucleótidos diferentes a éste (Figura 10). Los segundos poseen uno o varios nucleótidos diferentes (en posición 3' o 5') que posibilitan el alineamiento del iniciador en una posición específica con respecto al microsatélite (Figura 11).

BOR7 (AC)₈ = 5' ACACACACACACAC 3'

[illegible][illegible]

Producto 1
PCR *bona*
fide

[illegible]

TGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN ACACACACACACA**CACACACACACACACA**
ACACACACACACACACACACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

Producto 2
PCR *bona*
fide

23

Calva-Calva, G y J. Pérez-Vargas (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6(11): 2-16.

Chanfón Kung, S (2007) Flor de manita: Una “manita” para el corazón y los nervios. *CONABIO. Biodiversitas* 74: 13-15.

Chia, J (2009) Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. Tesis Maestría. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, 118 p.

Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (2007) Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México, 594 p.

Fernández Pérez J., C. Jiménez Artacho y J. Fonfría Díaz (2008) El árbol de las manitas ¿Ejemplar único? En La mirada del otro pp. 21-36. Disponible en línea en http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/2343/El_arbol_de_las_manitas_36_02. Consultado el 02 de Mayo del 2016.

González-Espinosa, M., J. A. Meave, F. G. Lorea-Hernández, G. Ibarra-Manríquez and A. C. Newton (2011) The red list of Mexican cloud forest trees. *Fauna & Flora International*. 152 p.

Kuklinski, C (2000) Farmacognosia. Editorial Omega. España. pp. 138-139.

Lara, A., R. Valverde, O. Rocha y L. Gómez (2003) Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata* en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 27(2): 29-42.

Lara, O. F y C. Márquez (1996) Plantas medicinales de México, composición, usos y actividad biológica. UNAM. 137 p.

Leyva, E., G. Navarro-Tovar, S. E. Loredó-Carrillo y M. S. Santos-Díaz (2011) Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. Boletín de la Sociedad Química de México 5(2,3), 35-43.

Marinucci, L., M. Ruscitti y W. Abedini (2004) Morfogénesis in vitro de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía 105(2): 27-36.

Mireles-Ordaz, J., A. Arellano-Perusquia, A. Espinal-Centeno, L. Sánchez-Segura, A. A. Estrada-Luna y A. Cruz-Ramírez (2015) Reprogramación celular de embriones de *Anthurium andraeanum* por fitohormonas para micropropagación masiva. Revista Electrónica Nova Scientia 15(7): 49-67.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Disponible en línea. Consultado en Mayo del 2016. www.biodiversidad.gob.mx/pdf/NOM-059-ECOL-2001.pdf

Osuna-Fernández, H. R (1997) Estructura y respuesta germinativa de semillas de plantas medicinales: *Chiranthodendron pentadactylon* y *Talauma mexicana*. Facultad de Ciencias, División de Estudios de posgrado, UNAM., Ciudad de México. 132 p.

Oyama, K (1989) Herbívoros y plantas como interactúan. Ciencia 9:38-46.

Pérez-Alonso, N y E. Jiménez (2011) Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal 11(4): 195-211.

Rates, S. M. K (2000) Plants as source of drugs. Toxicon 39:603–613.

Sánchez-Chiang, N y V. M. Jiménez (2009) Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 135-151.

Santaella-Quintas, D. L (2010) Efecto de fitorreguladores (AIB y GA3) en el establecimiento de plántulas de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. Facultad de Ciencias, UNAM., Ciudad de México. 84 p.

Toribio, M y C. Celestino (2000) El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales.:* Fuera de Serie 2: 249-260.

Vásquez G. L. M (1998) El árbol de las manitas. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas. Segunda Edición, Toluca, México. 72 p.

Villarreal, M. L., A. Cardoso-Taketa, A. Ortiz y A. Sharma (2014) Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria* 15(8). Disponible en línea en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art62/>.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl (2005) DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods and Applications. Taylor & Francis Group. CRC press. EUA, 444 p.

Zarate-Rodríguez, J. E (2002) Caracterización Histológica de la flor de manita *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. (Sterculiaceae) usada en medicina tradicional. Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México.

Zhao, J., L. C. Davis and R. Verpoorte (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23:283-333.

I. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS FLORES DE *Chiranthodendron pentadactylon* Larr.

PHYTOCHEMICAL ANALISYS OF *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. FLOWERS

RESUMEN

La ‘flor de manita’ es una planta endémica de México que ha sido utilizada desde tiempos prehispánicos con fines terapéuticos, sin embargo al igual que muchas plantas medicinales no se tiene un conocimiento científico de los metabolitos secundarios que posee. El objetivo de este trabajo fue aislar y purificar algunos constituyentes fitoquímicos de esta especie. Mediante cromatografía en columna se aisló β -sitosterol de los extractos hexánico y de cloruro de metileno, mientras que del extracto metanólico se aisló sacarosa, compuestos que fueron confirmados con la interpretación de espectros de H^1 -RMN.

Palabras Clave: β -Sitosterol, *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., Cromatografía en columna, Fitoquímica, RMN.

ABSTRACT

The plant named as 'flor de manita' is endemic in Mexico that has been used since pre-Hispanic times for therapeutic purposes, however like many medicinal plants do not have a scientific knowledge of secondary metabolites possessing. The aim of this work was to isolate and purify some phytochemical constituents of this specie. By column chromatography β -sitosterol of hexane extracts and methylene chloride was isolated, while the metanolic extract sucrose, compounds were confirmed with the interpretation of H^1 -NMR spectra was isolated.

Index words: β -Sitosterol, *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., Chromatography column, NMR, Phytochemistry.

INTRODUCCIÓN

La historia de la producción de medicamentos o remedios es tan antigua como la historia de nuestro país, todas las culturas prehispánicas utilizaron remedios para aliviar el dolor, basados fundamentalmente en productos naturales. Las prácticas médicas de los toltecas, cultura madre para todas las culturas posteriores, son descritas por Bernardino de Sahagún "... sabían y conocían las cualidades y virtudes de las hierbas, que sabían las que eran de provecho y las que eran dañosas y mortíferas ... y por la gran experiencia que tenían de ellas dejaron señaladas y conocidas las que ahora se usan para curar" (Plascencia-García, 2009). La herbolaria, forma parte de la medicina alternativa, tradicional y/o complementaria. La planta o hierba medicinal según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es todo aquel vegetal que contiene uno o varios principios activos que pueden ser utilizados en el tratamiento favorable de ciertas enfermedades. Es la forma más antigua para el cuidado de la salud que conoce la humanidad. Examina las propiedades curativas de gran diversidad de plantas. En Europa más del 48 % de la población se trata con plantas medicinales. En Estados Unidos, la emplean cerca del 58 % y para México se estima en cerca del 60 % (López-Herranz, 2006).

De los aproximadamente 10-100 millones de especies u organismos vivos sobre la tierra, las plantas superiores forman un grupo de 250 000 especies, de las cuales sólo el 6 % ha sido investigado por su actividad biológica y el 15 % por sus componentes químicos (Gurib-Fakim, 2006). Las plantas son fuente de un gran número de productos metabólicos de importancia comercial y son usados en la industria farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuente de numerosas sustancias de interés agroquímico. Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas. Aproximadamente 1 600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

A pesar de la riqueza y variedad de la flora medicinal mexicana, el porcentaje de especies botánicas farmacológicamente estudiado hasta ahora es bajo. Por lo que, el potencial de las plantas medicinales mexicanas como fuente de nuevos fármacos y principios activos no se ha explorado completamente (Ponce-Monter *et al.*, 2008).

Chiranthodendron. pentadactylon Larr. es una planta originaria de México se le conoce con los nombres comunes de flor de manita, “mapilxochitl”, “macpaxochitl”, “macpalxochicuahuatl”, “ita nada”, “tundakua”, árbol de las manitas, manita, mano de león, mano de dragón, palo de tabuco y palo de yaco, crece en el bosque mesófilo de montaña a 2,400 metros sobre el nivel del mar. Actualmente se utiliza principalmente contra las afecciones del corazón como cardiotónico y para regular la presión arterial. Otros usos menos frecuentes son para el control de la diarrea y la disentería, la epilepsia, en el dolor de cabeza, mareos post parto, como tranquilizante y como planta de sombra u ornato por su follaje y la belleza de sus flores rojas (Velázquez-González, 2006).

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico provenientes de plantas se ha incrementado en los últimos años dada la limitación de los procesos de obtención de medicamentos basados en la síntesis química. A esto se le suma la gran diversidad química de estos sobre los compuestos sintéticos y la intensa actividad biológica como resultado de la selección natural. Adicionalmente, el costo de los biofármacos limita su disponibilidad en un amplio sector del mercado y no satisface las necesidades de la población mundial. Otro aspecto de gran interés ha sido que muchas especies vegetales están en peligro de extinción o se han extinguido debido a los problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de las fuentes naturales (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

El objetivo de este estudio fue investigar los productos naturales de la ‘flor de manita’, aislar mediante cromatografía en columna los constituyentes fitoquímicos y caracterizar los compuestos aislados empleando técnicas espectroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron 2000 flores frescas en la localidad de San Miguel Tlaixpan, Texcoco Estado de México, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Productos Naturales en el Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. La identificación del material fue realizada por la M en C. Ernestina Cedillo Portugal, se depositó una muestra en el Herbario de la División de Ciencias Forestales, de la misma Universidad, con número de folio 25494.

Preparación de extractos

Los extractos de 'flor de manita' fueron preparados a partir de 2000 flores secas (5.3 kg). El proceso de secado se realizó a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y a la sombra, posteriormente se molieron en un molino Thomas-Wiley con un tamiz del número 2. Después se sometieron a maceración con hexano durante 48 horas (7L x 3) a temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Del extracto recuperado por filtración, se evaporó el disolvente a presión reducida y calentamiento suave, en un rotavapor BÜCHI R-210. Después de eliminar el hexano del residuo vegetal, se adicionó cloruro de metileno (7L x 3) y se repitió el procedimiento de filtración y eliminación del disolvente. Dicho residuo se maceró nuevamente con metanol (7L x 3), siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, se obtuvieron 26.5 g de extracto hexánico seco; 29.5 g de extracto de cloruro de metileno y 829.7 g de extracto metanólico seco.

Análisis de los extractos

Los extractos de 'flor de manita' fueron analizados por cromatografía en columna (CC) empleando gel de sílice como fase fija con un tamaño de partícula de 0.063-0.20 mm. Como fase móvil se utilizó hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol o bien mezclas de estos en orden creciente de polaridad. Todas las fracciones fueron monitoreadas con cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Merck 60 F254) que fueron observadas con luz UV, sulfato cérico y ácido fosfomolibdico, según fue requerido. De manera adicional a la

percolación, la fracción del extracto metanólico fue sometida a una acetilación (100 mg) se le adicionaron anhídrido acético (1 mL) y piridina (1 mL), manteniéndose en agitación vigorosa durante 12 horas. Enseguida, se agregó hielo picado (10 g) y se realizaron 3 extracciones con acetato de etilo (5 ml) reuniéndose las fases orgánicas, mismas que fueron lavadas con HCl al 10 % (v/v) por tres veces; después la fase orgánica se lavó con Na₂CO₃ al 10 % (p/v) tres veces y finalmente con agua y secada con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó en un rotavapor a presión reducida.

Elucidación Estructural

La estructura de los compuestos aislados se estableció en base al análisis de los espectros de H¹-RMN. Todos los espectros fueron tomados a 20 °C utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃) como estándar interno; los desplazamiento químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En una sola planta pueden encontrarse varios componentes biológicamente activos, en donde el principal determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión. Sin embargo, el grado en el que los componentes secundarios influyen sobre la acción biológica queda puesto de manifiesto al aislar el principio activo principal. Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta; si no que se concentran preferentemente en las flores y las hojas (Pawlow, 1985). En este trabajo se aislaron metabolitos en las flores, que son la parte utilizada de manera tradicional para tratar algunos padecimientos.

Identificación de los compuestos aislados

Del extracto hexánico y de cloruro de metileno se aislaron unas agujas blanquecinas, de las cuales el espectro de H¹-RMN es superponible con el de β-sitosterol, temperatura de fusión: 124 a 135 °C (130-134 °C, McCarthy *et al.*, 2005). De acuerdo con Spengler-Salabarría *et al.* (2009), se presentan los datos siguientes en el espectro H¹-RMN (Figura 1.1) las señales que aparecen en la región entre 0,66 y 0,99

ppm corresponden a los grupos metilo de la molécula. En la Figura 1.1 se observan dos singletes a 0,67 y 0,99 ppm característicos de los protones de los metilos C18 y C19 respectivamente; tres dobletes en 0,80, 0,81, 0,90 y un triplete a 0,83 ppm asignables a los protones de los metilos C27, C26, C21 y C29 respectivamente del esqueleto de los fitosteroles del grupo estigmastano. El corrimiento químico del multiplete en 3,51 ppm es característico del protón de C3 cuando está sustituido por un grupo hidroxilo. En la zona de los hidrógenos vinílicos se observó un doblete en 5,34 ppm y su constante de acoplamiento resultó 5,1 Hz, característico del protón vinílico del C6 en los esteroides.

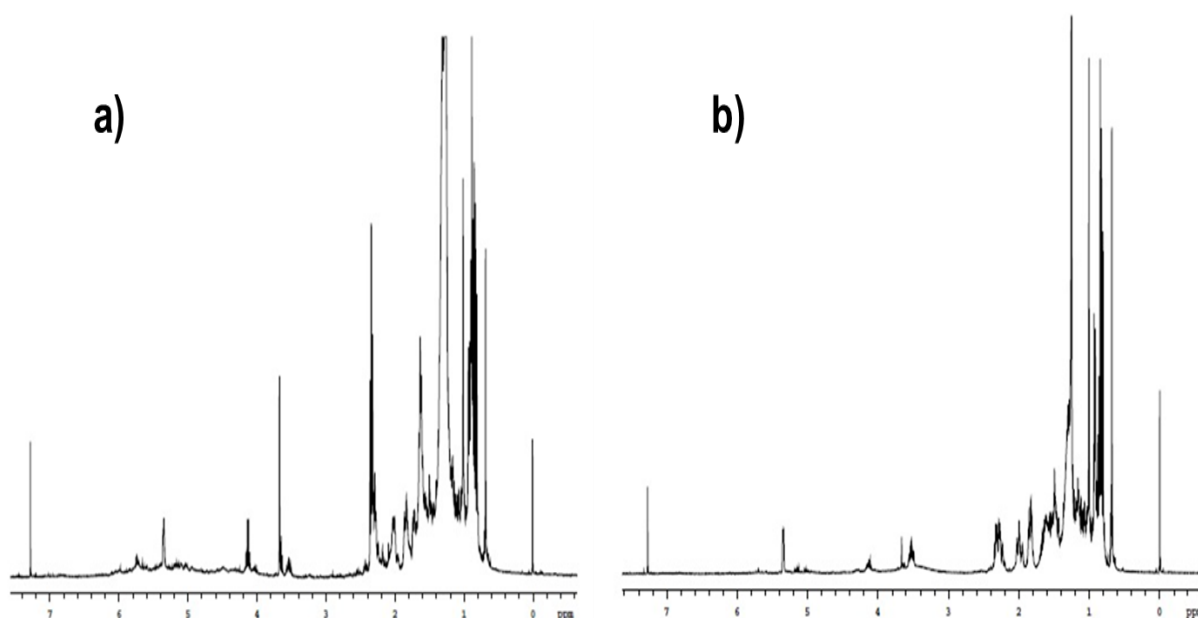


Figura 1.1. Espectros de H^1 -RMN de β -Sitosterol, aislado de a) del extracto hexánico y b) del extracto de cloruro de metileno.

Al comparar los valores de punto de fusión, R_f (Verdezoto, 2013) comparando los componentes aislados contra una muestra identificada de β -sitosterol (Figura 1.2) y los datos espectroscópicos obtenidos con estas características se encontró coincidencia con Δ^5 -estigmastan- β -3-ol (Figura 1.3) conocido por β -sitosterol.

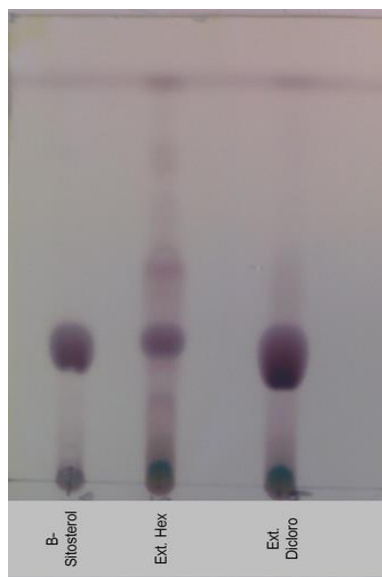


Figura 1.2. Cromatografía en Capa Delgada de los componentes aislados. Valor de Rf para β -Sitosterol 0.28, con eluyente Hexano:Acetato de etilo (8:2).

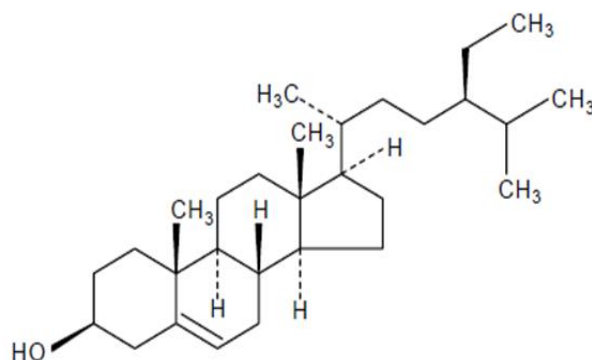


Figura 1.3. Estructura de β -sitosterol.

La actividad farmacológica de las plantas reside principalmente en un grupo diverso de compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran los fitosteroles, que intervienen en el funcionamiento de las membranas y el transporte de los ácidos grasos. Dentro del metabolismo secundario de las plantas, los fitosteroles se sintetizan por la vía del ácido mevalónico (Hung-Llamos *et al.*, 2008). En estudios anteriores (Domínguez y Gutiérrez, 1972) ya se ha reportado la presencia de β -sitosterol en la 'flor de manita', actualmente se tiene mayor conocimiento de las actividades farmacológicas de dicho fitosterol (Cuadro 1.1, Soodabeh Saeidnia *et al.*, 2014) que sirven de soporte científico a los múltiples usos tradicionales y medicinales de esta planta. En términos generales β -sitosterol es

utilizado como agente antioxidante y antidiabético, inhibe la absorción del colesterol, es antiinflamatorio y no toxico (Amit Sen *et al.*, 2014).

Cuadro 1.1 Actividades farmacológicas del β -sitosterol.

	Actividad
Antiinflamatorio	Disminución de la hipersensibilidad
Inducción de la apoptosis	Inhibe crecimiento de células tumorales de cáncer de mama
Efecto quimioprotector o quimiopreventivo	Inhibe el desarrollo de cáncer de colon y mama.
Actividad	Disminuye niveles de colesterol en sangre
Hipocolesterolémica	
Efectos angiogénicos	Promueve la cicatrización de heridas
Efectos de genotoxicidad	Altas dosis de este fitosterol No han mostrado efectos genotóxicos ni citotóxicos
Bioensayos analgésicos	Disminución del dolor
Actividad antihelmíntica y antimutagénica	En pruebas <i>in vitro</i> contra <i>Ascarissuum</i>
Actividad Inmunomodular	Aumento de la proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos-T
Tratamiento del cáncer prostático	Diminución del crecimiento de células tumorales
Efecto antioxidante	Estimula la producción de enzimas antioxidantes
Neuroprotección	Efecto positivo en los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer
Efecto antidiabético	Reduce los niveles de glucosa.

En el estudio del extracto metanólico se identificó la sacarosa: pf: 165-175°. H^1 -RMN (400 MHz, D_2O): 5.37 (1H, d, H-1), 4.17 (1H, d, H-3'), 4.01 (1H, t, H-4'), 3.85 (1H, m, H-5'), 3.81 (1H, m, H-5), 3.78 (2H, s, ancha, H-6), 3.71 (1H, t, H-3), 3.63 (2H, s, H-1'), 3.52 (1H, dd, H-2), 3.42 ppm (1H, t, H-4) (Figura 1.4).

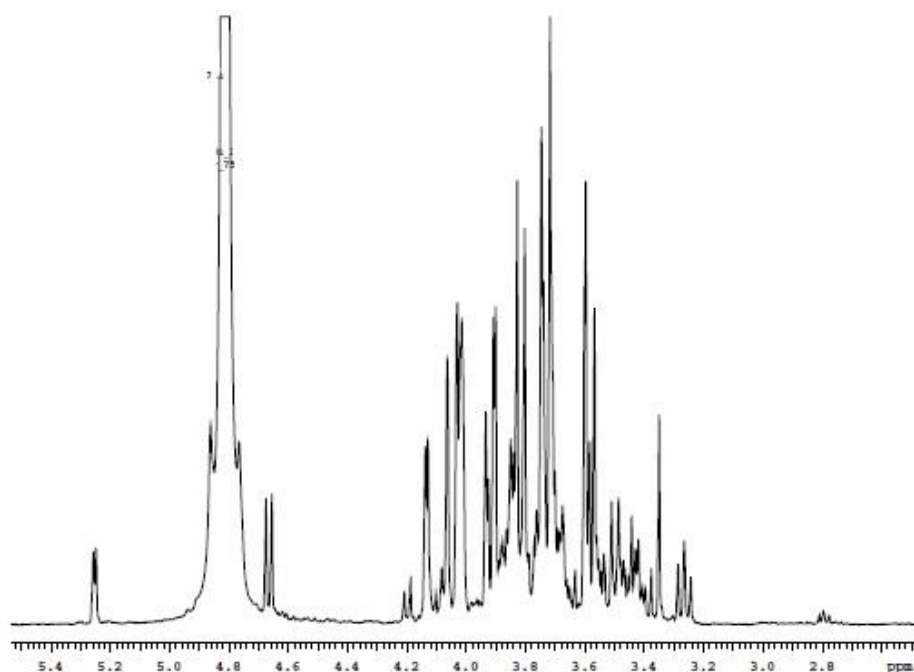


Figura 1.4 Espectro de ^1H -RMN de Sacarosa, aislada del extracto metanólico.

La sacarosa, uno de los principales productos de la fotosíntesis en las plantas superiores, es la forma principal en la que los carbohidratos son trasladados de las hojas hacia el resto de la planta, el suministro de carbono y energía son esenciales para el crecimiento. Además, este azúcar es el principal carbohidrato de almacenamiento en algunas plantas, que aparece en las hojas, ramas, tubérculos y frutas. Por otro lado, la sacarosa es muy importante en las plantas para la aclimatación al estrés ambiental causada por el frío, la sal y la sequía (Sánchez *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

El compuesto obtenido de los extractos hexánico y de diclorometano de la 'flor de manita' fue β -sitosterol, presumiblemente, responsable de la actividad biológica de esta especie. En el extracto metanólico se identificó a la sacarosa. Existe una aplicación potencial de la biodiversidad de plantas en México, para extraer metabolitos

secundarios que puedan utilizarse como antioxidantes, colorantes, esencias o nuevos fármacos sin llegar a la sobreexplotación de los recursos naturales.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del laboratorio de Productos Naturales de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. A la Dra. Diana Guerra y al Dr. Holber Zuleta por sus oportunas y edificantes aportaciones, a todos los compañeros de diferentes proyectos de investigación con quien compartimos instalaciones y tiempo agradable.

BIBLIOGRAFÍA

Amit Sen, P. Dhavan, K. Kumar Shukla, S. Singh and G. Tejovathi (2012) Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. Science Secure Journal of Biotechnology 1(1): 9-13.

Dominguez, X. A. y A. Gutierrez (1972) Extractives from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon*. Phytochemistry 11: 2895.

Gurib-Fakim, A (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93.

Hung-Llamos, B. R., A. Falero-Morejón, C. Pérez-Bolaños, S. Tirado-Morales, Y. B. Quiñones y M. Pineda-Rodríguez (2008) Fitosteroles. Parte 2: Fuentes de obtención, formas decuso y posición actual en el mercado. Revista CENIC Ciencias Biológicas 39(2): 97-104.

López-Herranz, G.P (2006) Interacción entre hierbas medicinales y agentes anestésicos. Revista Médica del Hospital General de México 69 (2): 108-112.

McCarthy F. O., J. Chopra, A. Ford, S. A. Hogan, J. P. Kerry, N. M. O'Brien, E. Ryan and A. R. Maguire (2005) Synthesis, isolation and characterization of β -sitosterol and β -sitosterol oxide derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3(16):3059-3065.

Pawlow, M (1985) El gran libro de las plantas medicinales. Editorial. Everest. España 460 p.

Pérez-Alonso, N y E. Jiménez (2011) Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195-211.

Plascencia-García, M (2009) La Industria Farmacéutica en México Boletín de la Sociedad Química de México 3(1), 30-31.

Ponce-Monter, H., N. Pérez-Hernández, E. Fernández-Martínez, M. I. Ortiz, A. Macías-Jiménez and M. G. Campos (2008) Mexican medicinal plants and smooth muscle. In: *Trends and Advances in Medicinal Plants*: 123-145. Ed. María Salud Pérez Gutiérrez.

Sánchez, E, J.M. Soto, A. Núñez, J. M. Ruiz y L. Romero (2005) Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in greenbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(1): 55-61.

Soodabeh Saeidnia, Azadeh Manayi, Ahmad R. Gohari and Mohammad Abdollahi (2014) The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants* 4(5): 590-609.

Spengler-Salabarría, I., A. B. Valerino-Díaz, T. González-Morera, D. Gamio-tea-Turro e I. H. García-Pérez (2009) Estudio fitoquímico y de actividad alelopática del extracto de n-hexano del follaje de *Lantana trifolia* L. *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 40(1): 33-37.

Velázquez-González, C (2006) Evaluación *in vivo* de la actividad inhibidora de la secreción intestinal inducida por la toxina de *Vibrio cholerae* de 26 plantas medicinales: Estudio Fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* (Sterculiaceae). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina, Ciudad de México, 183 p.

Verdezoto, J (2013) Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae). Química Central 3(01): 37-42.

II. OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS DEL ÁRBOL DE ‘FLOR DE MANITA’ (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

***In vitro* OBTAINING CALLUS OF ‘FLOR DE MANITA’ TREE (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)**

RESUMEN

Una de las especies perteneciente a los ‘bosques de niebla’ es *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. y al igual que muchas de ellas se encuentra en riesgo de extinción, sus flores también conocidas como ‘flor de manita’ se utilizan en la medicina tradicional para aliviar afecciones del corazón. El objetivo de este trabajo fue evaluar diversas combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog para obtener el tratamiento óptimo y producir callos *in vitro* a partir de explantes derivados de la flor. El medio de cultivo básico fue el siguiente: medio de cultivo MS, suplementado con mioinositol ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cisteína ($60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa (3 %), agar ($7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ajuste de pH de 5.7 ± 0.1 . El explante con mejor respuesta a formar callos fue una sección de los estambres de la flor. Los reguladores que produjeron una respuesta de 78 % de callos viables fueron 2-4 D ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y K ($0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), en los mismos se registró un peso fresco promedio de 250 mg después de 60 días de incubación. Posteriormente se evaluó en los callos la presencia de metabolitos secundarios.

Palabras clave: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr, callogénesis, *in vitro*.

ABSTRACT

One of the species belonging to the 'cloud forests' is *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. and like many of them are at risk of extinction, its flowers also known as 'flor de manita' are used in traditional medicine to relieve heart conditions. The aim of this study was to evaluate various combinations of growth regulators in the Murashige and Skoog medium to obtain optimal treatment and produce in vitro callus from explants derived from the flower. The basic culture medium was as follows: MS medium supplemented with myoinositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Thiamine ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cysteine ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Sucrose (3 %), Agar ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and adjusting pH of 5.7 ± 0.1 . More responsive explant to form callus was a section of the stamens of the flower. Regulators which produced a response of 78 % viable calli were 2-4 D ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and K ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), at the same average fresh weight of 250 mg was recorded after 60 days incubation. Subsequently it evaluated in callus the presence of secondary metabolites.

Index words: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr, calogenesis, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

En el pasado, los bosques cubrían más de la mitad de la superficie de la tierra pero debido a los cambios en el uso del suelo, actualmente cubren sólo el 30 % de la superficie terrestre (Kataria *et al.*, 2013). En México los bosques mesófilos de montaña ('bosques de niebla') son de gran valor, debido a los bienes y servicios ecosistémicos que proporcionan. Poseen una gran diversidad botánica con más de 2, 800 especies de plantas registradas en su interior. La diversidad de especies de árboles equivale al 25 % del total, definen la estructura del bosque y contribuyen a la función ecológica y la capacidad de recuperación de los bosques. Los árboles también proporcionan una amplia gama de productos valorados por la población local. Desafortunadamente los 'bosques de niebla' de México, como en otras partes del mundo, están bajo amenaza severa, presentando peligro de extinción en distintos grados, dentro de las especies consideradas se encuentra el 'árbol de flor de manita' (González-Espinosa *et al.*, 2011). El 'árbol de las manitas', conocido hoy con el nombre científico de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., tiene una flor cuyos estambres rojos terminados en forma de uña recuerdan los dedos de una mano. De ahí su nombre vernáculo (Fernández-Pérez *et al.*, 2008). Durante mucho tiempo, la 'flor de manita' se ha venido utilizando en la medicina tradicional debido a que tiene una amplia variedad de usos medicinales, esta se utiliza principalmente en forma de té e infusión para controlar afecciones del corazón (regular la presión arterial), y como tranquilizante del sistema nervioso. Además también para el tratamiento de úlceras crónicas, antiinflamatorio (inflamación de los ojos), dolor de dientes, hemorroides, pero, sobre todo, antiepiléptico, e insomnio, también para combatir el "vacío emocional" y para "clarificar la conciencia", además se utiliza como planta de sombra y ornato en parques y jardines (Alemán-Ponce, 2010).

Desde hace muchos años los seres humanos han usado las plantas como fuente de fragancias, saborizantes y medicinas; usualmente estos compuestos cumplen un rol ecológico mediando la interacción de la planta con su ambiente, encontrándose generalmente en muy bajas concentraciones, por lo cual se hace necesario utilizar gran cantidad de material vegetal para obtener cantidades significativas del compuesto de

interés (Foley y Moore, 2005). Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas. Su acumulación en las plantas es baja (menos del 1 %), y ocurre en células, órganos y tejidos específicos, y bajo condiciones de estrés (Verpoorte *et al.*, 2002). En el caso de plantas silvestres, su explotación comercial está basada en la recolección de material en su hábitat natural, lo que ha provocado que muchas estén amenazadas o en peligro de extinción. El cultivo masivo de células vegetales se ha propuesto como una alternativa biotecnológica para el desarrollo de sistemas de producción de Metabolitos secundarios (Sharp y Doran, 2001), durante la última mitad del siglo pasado surgió esta alternativa para obtener estas moléculas sin necesidad de utilizar la planta completa (Arias *et al.*, 2009).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica para la obtención de metabolitos de interés, sobre todo en plantas que presentan una problemática de colecta, requieren períodos largos de cultivo y en el caso de la ‘flor de manita’ cuando las especies se encuentran en riesgo de extinción.

En su acepción amplia, las técnicas *in vitro* se definen como un conjunto muy heterogéneo de procedimientos que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, unas partes separadas del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos- se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2010).

En el cultivo *in vitro*, la producción es independiente de factores externos como disponibilidad de tierra, clima y condiciones geográficas; además es posible controlar las condiciones de cultivo, alcanzando mayor rendimiento y calidad (Arias *et al.*, 2009). Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional radican tanto en la obtención de plantas completas genéticamente homogéneas, tanto de callos, órganos o células productoras de sustancias activas bajo condiciones asépticas, pudiendo controlar el sustrato, la cantidad y calidad de luz, de humedad y temperatura, así como conseguir un aumento significativo en el rendimiento de los metabolitos específicos por alteración de las rutas metabólicas originales (Vanisree y Tsay, 2007).

Además, es posible reducir los costos e incrementar la productividad en sistemas cerrados y automatizados logrando una calidad uniforme y rendimientos constantes del producto (Paek *et al.*, 2005;).

El cultivo de células y tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencia celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo. Mediante esta herramienta, es posible obtener cultivos de células no diferenciadas, como callos y suspensiones celulares, además de cultivos de órganos como brotes y raíces. Los sistemas que operan a nivel comercial usan principalmente cultivos de células en suspensión (Zhao *et al.*, 2005).

La variedad de usos en la medicina tradicional de esta especie y el hecho de que se encuentre en riesgo de desaparecer, impulsan el interés por estudiar nuevas técnicas para obtener los metabolitos secundarios que de ella se obtienen. El objetivo de este estudio fue encontrar el medio de cultivo adecuado para la producción de callos *in vitro* a partir de explantes procedentes de la flor, posteriormente evaluar la presencia de metabolitos secundarios en los mismos y determinar si los niveles de diferenciación celular influyen en la síntesis de estos productos naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron flores en los meses de Enero y Febrero, procedentes de árboles cuya edad aproximada es de 125 años (Comunicación personal), en la localidad de San Miguel Tlaixpan, Texcoco Estado de México, las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Autónoma Chapingo en la misma entidad.

Control de contaminación y necrosis del material vegetal

Las flores se sometieron a un primer lavado con agua corriente, seguido por un lavado con detergente adicionado con Tween 20®, posteriormente se mantuvieron en

alcohol al 70 % durante 3 minutos, transcurrido ese tiempo se depositaron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 10 % durante 15 minutos se enjuagaron con agua destilada estéril por triplicado, después de esta metodología (a la que referiremos como metodología base) se realizaron los siguientes experimentos:

- a) *Control de contaminación:* Se estableció un experimento en medio MS sin suplementar que consistió de: Testigo (explantes tratados solamente con la metodología base), tratamiento I (la metodología base más un lavado por 20 minutos en una solución de Benomilo $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguido por un lavado con agua destilada estéril por triplicado) tratamiento II (la metodología base más la inmersión del tejido por 12 horas en una solución de Benomilo $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido cítrico $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido ascórbico $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en agitación, seguido por un lavado con agua destilada estéril por triplicado). Se utilizó un diseño completamente al azar, en total se evaluaron 20 unidades experimentales por tratamiento, cada unidad experimental consistió en un explante. Las variables evaluadas fueron, niveles de control de contaminación de explantes cultivados, representándose con la siguiente simbología; para control alto (+ + +), control medio (+ +) control bajo (+). Se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- b) *Control de necrosamiento (oxidación) del tejido:* Se estableció un experimento en medio MS sin suplementar que consistió de testigo (Medio MS), tratamiento I Medio MS adicionado con carbón activado ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tratamiento II Medio MS adicionado con PVP (polivinil pirrolidona) ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y L-cisteína ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tratamiento III Medio MS adicionado con L-cisteína ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y tratamiento IV Medio MS adicionado con nitrato de plata (AgNO_3) ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se utilizó un diseño completamente al azar, en total se evaluaron 20 unidades experimentales por tratamiento, cada unidad experimental consistió en un explante. Las variables evaluadas fueron, niveles de control de oxidación de explantes cultivados, representándose con la siguiente simbología; para control alto (+ + +), control medio (+ +) control

bajo (+). Se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Establecimiento *in vitro* de explantes

Se cultivaron explantes de 6 regiones de la flor (Figura 2.1), las zonas 1 a 5 corresponden a diferentes segmentos de los estambres, la zona 6 corresponde a segmentos del cáliz, los explantes se cultivaron en dos experimentos con cuatro diferentes tratamientos (Cuadro 2.1). El medio de cultivo base fue el siguiente: medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con myoinositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cisteína ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa (3%), agar ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ajuste de pH de 5.7 ± 0.1 . Se vertieron 20 mL de medio en frascos Gerber y se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos. La siembra se llevó a cabo en campana de flujo laminar.

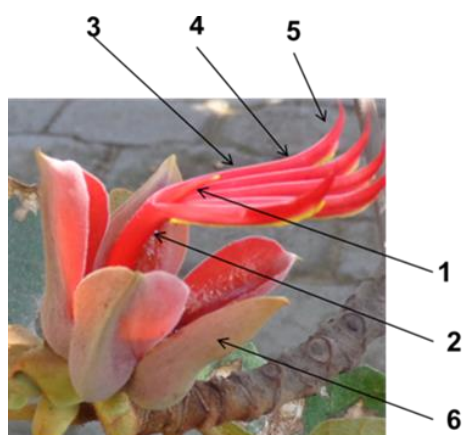


Figura 2.1 Regiones de la flor cultivadas *in vitro*.

Cuadro 2.1 Diseño experimental

	Experimento I		Experimento II	
	Reguladores de crecimiento		Reguladores de crecimiento	
	2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	K ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	TDZ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Testigo	0	0	0	0
Tratamiento 1	0.3	0.1	0.3	0.1
Tratamiento 2	1.0	0.3	1.0	0.3
Tratamiento 3	3.0	1.0	3.0	1.0

En cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones, en donde un explante corresponde a una repetición. Se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Evaluación del crecimiento de callos generados *in vitro*

Para determinar el medio con mejores resultados para el crecimiento de callos y verificar diferencias significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, mediante el programa Statistix de Windows® y para la discriminación de los tratamientos se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey. Una vez seleccionado el mejor tratamiento y explante, se sembró, se incubó y se evaluó el crecimiento de callo en base a peso fresco, el registro se realizó en tres diferentes tiempos t_0 (el día de siembra), t_1 (transcurridos 30 días) y t_2 (después de 60 días).

Metabolitos secundarios evaluados en los callos generados *in vitro*

Los callos producidos se molieron en mortero adicionando nitrógeno líquido para facilitar el secado, se secaron en horno a 35 °C durante 12 horas, posteriormente se registró el peso seco; se adicionó disolvente (hexano, cloruro de metileno y metanol, cada uno por separado en ese orden) en una proporción 1:10 (p/v), se dejó reposar la mezcla durante 48 horas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtró y el filtrado se concentró en un rotaevaporador BÜCHI (R-210). Los extractos obtenidos se compararon contra un patrón de β -sitosterol utilizando Cromatografía en Capa Delgada (CCD), sobre silica gel 60 GF254.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de contaminación y necrosis del material vegetal

El proceso de desinfestación funcionó de manera exitosa evitando con su aplicación la presencia de agentes contaminantes (hongos y bacterias). En el Cuadro 2.2 se muestran los resultados de los diferentes tratamientos para el control de contaminación. La aplicación del proceso tradicional no fue suficiente para lograr explantes libres de contaminantes, sin embargo la combinación de ésta con la inmersión del material vegetal en una solución de Benomilo 200 mg·L⁻¹, ácido cítrico 150 mg·L⁻¹ y ácido ascórbico 100 mg·L⁻¹ por un período de tiempo prolongado nos permitió ajustar el protocolo para obtener un gran porcentaje de explantes sanos.

Cuadro 2.2. Efecto de los diferentes tratamientos para el control de contaminación.

	Descripción	Nivel de control
Testigo	Explantos con la metodología base de desinfección.	-
Tratamiento I	Explantos con la metodología base más un lavado por 20 minutos en una solución de Benomilo 300 mg·L ⁻¹	+
Tratamiento II	Explantos con la metodología base más la inmersión del tejido por 12 horas en una solución de Benomilo 200 mg·L ⁻¹ , ácido cítrico 150 mg·L ⁻¹ y ácido ascórbico 100 mg·L ⁻¹	+++

+++ : control alto ++ : control medio; + : control bajo; - : no hay control.

En el cuadro 2.3 se muestran los resultados de la respuesta de los explantes a los diferentes tratamientos usados en el control de oxidación de los explantes. Los explantes cultivados en medio MS adicionado con L-cisteína (60 mg·L⁻¹) mostraron el mayor control en oxidación, permitiendo mejor desarrollo de los callos *in vitro*.

Cuadro 2.3 Efecto de los diferentes tratamientos para el control de la oxidación

	Descripción	Nivel de control
Testigo	Medio MS	-
Tratamiento I	Medio MS adicionado con carbón activado (100mg·L ⁻¹)	+
Tratamiento II	Medio MS adicionado con PVP (100 mg·L ⁻¹) y L-cisteína (60 mg·L ⁻¹)	+
Tratamiento III	Medio MS adicionado con L-cisteína (60 mg·L ⁻¹)	+++
Tratamiento IV	Medio MS adicionado con nitrato de plata (AgNO ₃) (200 mg·L ⁻¹).	++

+++ : control alto ++ : control medio; + : control bajo; - : no hay control.

Establecimiento del cultivo *in vitro*

Dado que el metabolismo se ve afectado por la composición y concentración de los diferentes nutrientes, es posible inducir cambios en el crecimiento y en la producción, manipulando el medio de cultivo (Raval *et al.*, 2003). Se observó que: de los dos experimentos realizados, los tratamientos propuestos del experimento dos no presentaron respuesta a la formación de callo (datos no se muestran). Sin embargo, el experimento uno proporcionó una respuesta satisfactoria y se realizó el análisis de

varianza para dicho experimento (Cuadro 2.4) en el cuál se evaluó el porcentaje de formación de callos en los diferentes tratamientos. El mejor explante fue aquel proveniente de la región número dos (Figura 2.1), por lo tanto nuestros resultados demuestran que explantes provenientes de la flor son convenientes para la formación de callos.

Cuadro 2.4. ANOVA del efecto de los tratamientos en la formación de callos.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F _c	F _t	SIG
Tratamientos	16945	3	5648.33	251.03	3.23	*
Error experimental	360	16	22.5			
Total	17305	19				

*Significativo (5 %)

Una variedad de factores modifican las respuestas morfogénicas observadas en los explantes cultivados *in vitro*. Todos estos factores pueden resumirse en el término “control fisiológico”, haciendo referencia a los factores físicos y químicos que se encuentran dentro de las células o en el ambiente que rodea a las células (Marinucci *et al.*, 2004). De los resultados obtenidos del ANOVA con un nivel de significancia del 5 % se concluye que no todos los tratamientos producen el mismo efecto en la respuesta a formación de callos, de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey el mejor tratamiento es el número dos (Cuadro 2.5) con un porcentaje promedio de 78 para callogénesis, en dicho tratamiento la combinación de reguladores es 2,4-D (1 mg·L⁻¹) y K (0.3 mg·L⁻¹).

Cuadro 2.5. Comparación de medias.

Factor	Nivel	n	Formación de callos (%)
Reguladores de Crecimiento	Testigo	10	8 _c
	Tratamiento 1	10	7 _c
	Tratamiento 2	10	78 _a
	Tratamiento 3	10	21 _b

Notas: **n**, número de observaciones; valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

En general, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende, en mayor medida, de la interacción entre el nivel hormonal endógeno y el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo. De acuerdo a esto, cada explante o un mismo explante pero de diferente especie, pueden responder de manera distinta a una misma concentración de reguladores de crecimiento, a causa de diferencias en el contenido hormonal endógeno (Marinucci *et al.*, 2004). La mayoría de los cultivos requieren un aporte exógeno de auxinas y citocininas naturales o sintéticas. Dentro de las auxinas sintéticas una de las más empleadas es el 2,4-D, cumple diversas funciones una de ellas es la estimulación de la elongación celular. En cultivos *in vitro* son utilizadas en la inducción de callos (Arias-Zabala *et al.*, 2009).

Por otro lado, tenemos la kinetina, la cual es una citocinina, una fitohormona que regula, a través de una compleja red de interacciones con las auxinas, con el ambiente y con otras moléculas de la planta, diversos eventos entre los que se destaca la mitosis. En cultivos celulares se utilizan, al igual que las auxinas, en la inducción de callos (Arias-Zabala *et al.*, 2009). Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas, permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas (Boeri, 2015).

Las condiciones ambientales en las que se incuba un explante también tienen influencia en los resultados, más si como componente de los medios de cultivo figuran las auxinas, ya que estas tienen la particularidad de ser afectadas por la luz que causa un efecto destructor en el sistema enzimático que convierte el triptófano en ácido indolacético, fenómeno conocido como fotooxidación (Kryvenki *et al.*, 2008). Es por ello, que los explantes fueron incubados en condiciones de oscuridad.

La presencia de 2,4-D induce el desarrollo de callos friables y blancos provenientes de explantes de tallo u hojas y manteniendo los callos en un medio con las mismas concentraciones de 2,4-D utilizadas se induce la callogénesis (Simões *et al.*, 2010). Los callos se definen como tejidos obtenidos por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una

desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que da origen a una masa amorfa de tejido (Hurtado y Merino, 1997). En este trabajo los callos obtenidos presentaron las siguientes características: callos blancos, blancos con coloraciones rosas, en ambos casos friables a los 30 días de incubación, cambiando su consistencia hacia callos amarillentos y semicompactos a los 60 días de incubación (Figura 2.2).

Los callos pueden presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras que otros forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie (se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo). El tipo y grado de pigmentación está marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. (Hurtado y Merino, 1997). El cambio de coloración en los callos generados en esta investigación pueden ser causa de la oxidación, la cual activa el mecanismo fisiológico de defensa, con la finalidad de contrarrestar los factores estresantes producto de las condiciones *in vitro*, así como a la naturaleza de los explantes de generar compuestos fenólicos de acuerdo a Santana-M *et al.* (2010).

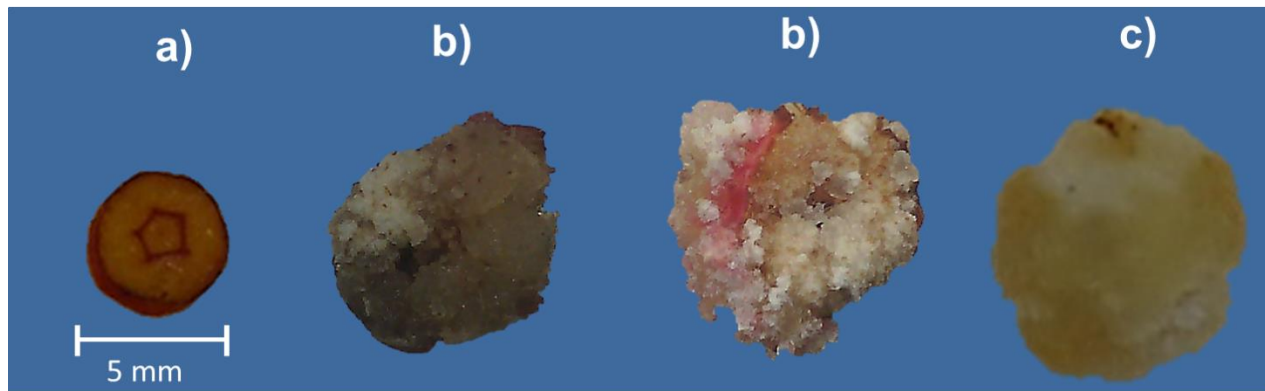


Figura 2.2. Aspecto físico de a) el explante obtenido de la región 2 en el t_0 , b) callos producidos a los 30 días de incubación y c) callos generados a los 60 días después de la siembra. En medio de cultivo MS, suplementado con mioinositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cisteína ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa (3%), Agar ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 2-4 D ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), K ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ajuste de pH de 5.7 ± 0.1 .

Evaluación del crecimiento de callos generados *in vitro*

Los callos se empezaron a formar a partir de la tercera semana en la superficie del explante. El crecimiento de los callos se muestra en la Figura 2.3, el peso fresco de los mismos se encontró en un promedio de 250 mg. La velocidad de propagación depende del subcultivo. En el caso de cultivos prolongados, los nutrientes en el medio se agotan gradualmente, y al mismo tiempo, la humedad relativa en los frascos disminuye dando lugar a la deshidratación del medio de cultivo. En el Cuadro II.6 se presenta el registro del peso fresco en cada uno de los tiempos evaluados. El subcultivo también disminuye los efectos de competencia por los nutrientes (Rou *et al.*, 2000). Por lo anterior se realizó un subcultivo a los 30 días

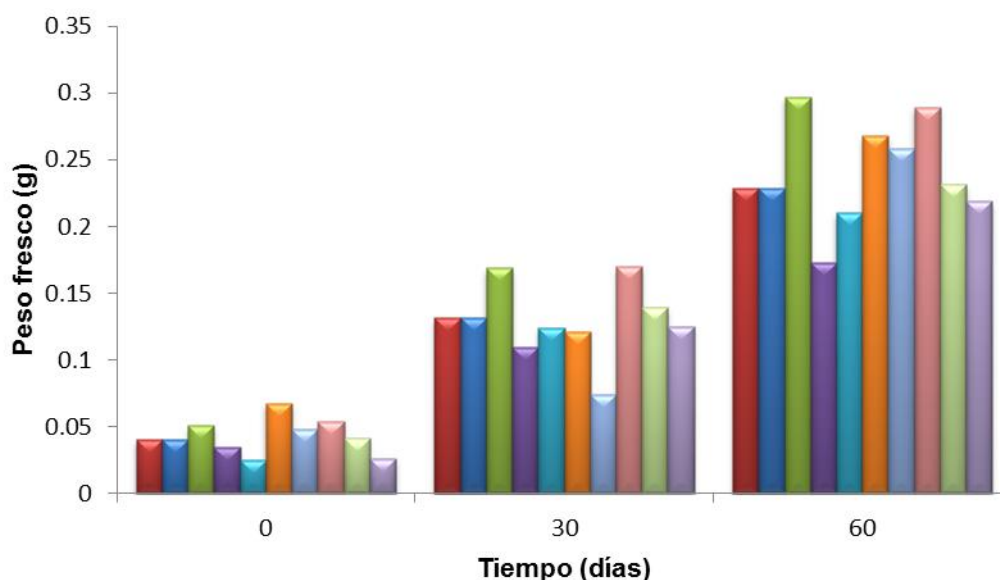


Figura 2.3. Crecimiento de los callos evaluados. En medio de cultivo MS, suplementado con myoinositol ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cisteína ($60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa (3 %), agar ($7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 2-4 D ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y K ($0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ajuste de pH de 5.7 ± 0.1 .

Cuadro 2.6. Evaluación de peso fresco de callo.

Tiempo (Días)	Repetición									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.0475	0.0403	0.0507	0.0345	0.0249	0.0679	0.048	0.054	0.0414	0.0264
30	0.2002	0.1313	0.169	0.1101	0.1243	0.1213	0.0745	0.1701	0.1392	0.1254
60	0.2503	0.2291	0.2972	0.1728	0.2101	0.2679	0.2581	0.2895	0.2315	0.2186
Peso en gramos										

Transcurridos 60 días se realizó la evaluación de metabolitos secundarios presentes en los callos generados.

Metabolitos secundarios evaluados en los callos generados *in vitro*.

En el capítulo anterior se observó que en los extractos de la flor se encuentra β -sitosterol como metabolito secundario, por lo que una vez obtenidos los extractos de los callos se realizó una comparación de ésta sustancia contra los mismos. El análisis por CCD se muestra en la Figura 2.4. Se observa la presencia de β -sitosterol en todos los extractos obtenidos de callos ($R_f = 0.84$, eluyente Cloruro de metileno:Metanol 95:5), lo

que sugiere que se puede obtener dicho producto mediante el cultivo *in vitro* de explantes de la flor.



Figura 2.4. Comparación de los extractos obtenidos de callos respecto al β -sitosterol

Como una opción para la producción de metabolitos secundarios de plantas que se encuentran en riesgo de extinción se presenta el cultivo de callos desdiferenciados, los cuales pueden ser transferidos a un medio líquido para formar cultivos de células en suspensión que pueden crecer en biorreactores, de forma similar a las fermentaciones microbianas. Se ha producido en cultivo de células vegetales una amplia variedad de compuestos útiles en alimentos incluyendo sabores, colorantes, aceites esenciales, edulcorantes, antioxidantes y nutraceuticos y se han desarrollado varios sistemas de células en suspensión a gran escala. Las células vegetales son también excelente fuente para aislamiento de enzimas mucho mejores, en algunos casos, que las de la planta diferenciada misma (Alfermann y Petersen, 1995).

CONCLUSIONES

Se logró una producción de 78 % de callos viables a partir de explantes del estambre de la 'flor de manita' en el medio de cultivo MS suplementado con 2-4 D ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y K ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), myoinositol ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), L-cisteína (60

mg·L⁻¹), sacarosa (3 %). Se obtuvieron callos blancos y friables a los 30 días, cambiando a callos amarillentos y semicompactos a los 60 días. Se observó la presencia de β -sitosterol en los extractos obtenidos de los callos.

AGRADECIMIENTOS

A el Sr. Margarito Cruz Segura, por su valioso apoyo en proporcionarnos el material vegetal necesario para llevar a cabo esta investigación. A los compañeros, personal docente y técnico involucrados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por su apoyo y propuestas.

BIBLIOGRAFÍA

Alemán-Ponce J. A (2010) Lecitinas de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) purificación y su función vasorelajadora. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Miguel de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. 98 p.

Alfermann, A. W and M. Petersen (1995) Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 199-205.

Arias, M., A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya y J. Restrepo (2009) Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios Dyna 76(157): 109 -121.

Arias-Zabala, M., M. J. Angarita-Velásquez, A. M. Aguirre-Cardona, J. M. Restrepo-Flórez y C. Montoya-Vallejo (2009) Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 62(1): 4881-4895.

Boeri, P (2015) Nutrientes para las plantas de probeta. En: Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de La Plata (eds), Argentina. pp: 46-72.

Comunicación Personal. Sr. Margarito Cruz Segura. Propietario de los árboles muestreados en San Miguel Tlaixpan Texcoco, Estado de México y proveedor de flor de manita del Mercado de Sonora (Ciudad de México).

Fernández Pérez J., C. Jiménez Artacho y J. Fonfría Díaz (2008) El árbol de las manitas ¿Ejemplar único? En La mirada del otro pp. 21-36. Disponible en línea en [http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/2343/El arbol de las manitas 36_02](http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/2343/El_arbol_de_las_manitas_36_02). Consultado el 02 de Mayo del 2016.

Foley, W. and B. Moore (2005) Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores- from physiological regulation to ecosystem function. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 430-435.

González-Espinosa, M., J. A. Meave, F. G. Lorea-Hernández, G. Ibarra-Manríquez and A. C. Newton (2011) The red list of Mexican cloud forest trees. *Fauna & Flora International*.

Hurtado, D. y M. Merino (1997). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial trillas. México, DF 232 p.

Kataria, N., K. Yadav, S. Kumari and N. Singh (2013) Micropropagation: An Important Tool for Conserving Forest Trees. *Pertanika Journals. Tropical Agricultural Science* 36(1): 1-26.

Kryvenki, M., R. G. Kosky, D. Guerrero, M. Domínguez y M. Reyes (2008) Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal* 8(2): 91-98.

Marinucci, L., M. Ruscitti y W. Abedini (2004) Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía 105(2): 27-36.

Mroginski I., P. Sansberro y E. Flaschland (2010) Establecimiento de Cultivos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio INTA: 70-84.

Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Paek, K. Y., D. Chakrabarty and E. J. Hahn (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 287-300.

Sharp, J. M. and P. M. Doran (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnology Progress. 17: 979-992.

Raval, K., S. Hellwing, G. Prakash, A. Ramos, A. Srivastava and J. Büchs (2003) Necessity of two stage process for the production of azadirachtin related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. Journal of Bioscience and Bioengineering 96(1): 16-22.

Rout, G. R., S. Samantaray and P. Dasa (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances 18: 91–120.

Santana-M, G. F., R. Velásquez-S y J. Mata (2010) Efecto de la fuente de carbono sobre la organogénesis y embriogénesis somática en cacao. Análisis Citogenético. Agronomía Tropical 60(2): 193-202.

Simões, C., N. Albarello, C. Henriques-Callado, T. Carvalho de Castro and E. Mansur (2010) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of *Cleome rosea* Vahl. Brazilian Archives of Biology and Technology 53(3): 679-686.

Vanisree, M. and H. S. Tsay (2007) Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 267-285.

Verpoorte, R., A. Contin and J. Memelink (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews 1: 13-25.

Zhao, J., L. C. Davis and R. Verpoorte (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23: 283-333.

III. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ÁRBOL DE 'FLOR DE MANITA' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

GENETIC DIVERSITY IN TREE OF 'FLOR DE MANITA' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.)

RESUMEN

El árbol de 'flor de manita' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.) es una especie que se encuentra en peligro de desaparecer, cuyas flores se han utilizado desde tiempos prehispánicos con fines medicinales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética mediante marcadores moleculares ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas) en tres poblaciones: Carrizal de Bravo en el Estado de Guerrero, Chapingo, San Miguel Tlaixpan y un árbol de Toluca en el Estado de México. Las amplificaciones utilizando 20 iniciadores generaron 129 bandas. Las poblaciones de Chapingo y San Miguel Tlaixpan mostraron estar genéticamente más cercanas entre sí y alejadas del árbol de Toluca agrupado a mayor distancia. La mayor diversidad genética detectable se encontró entre las poblaciones (57.55 %). El porcentaje total de *loci* polimórficos entre poblaciones fue de 49.61. La población de Guerrero mostró el mayor índice de diversidad genética de Nei ($H = 0.1597$). El grado de flujo genético fue bajo ($N_m = 0.37$), lo que sugiere que hay menos de un migrante por generación entre las poblaciones. Las poblaciones se encuentran en proceso de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.57$).

Palabras Clave: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., ISSR, marcadores moleculares, variabilidad genética.

ABSTRACT

The tree of 'flor de manita' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.) is a species that is in danger of disappearing, whose flowers have been used since pre-Hispanic times for medicinal purposes. The aim of this work was to evaluate genetic diversity using molecular markers ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) in three populations: Carrizal de Bravo in Guerrero State, Chapingo, San Miguel Tlaixpan and a tree of Toluca in Mexico State. Amplification using 20 primers generated 129 markers. The populations of Chapingo and San Miguel Tlaixpan showed to be genetically closer to each other and away from the Toluca tree. Most detectable genetic diversity was found among populations (57.55 %). The total percentage of polymorphic loci among populations was 49.61. The population of Guerrero showed the highest rate of Nei genetic diversity ($H = 0.1597$). The gene flow was low ($N_m = 0.37$), suggests that there is less than one migrant per generation among populations. Populations are in process of genetic differentiation ($G_{ST} = 0.57$).

Index words: *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., genetic variability, ISSR, molecular makers.

INTRODUCCIÓN

En los bosques mesófilos de montaña y en los mixtos de pino y encino de los Estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla, Chiapas y en regiones de Guatemala, crece un árbol frondoso; el 'árbol de flor de manita' (*Chiranthodendron pentadactylon* Larr.), de tronco ancho y gran altura, que produce una flor leñosa de cuyo interior salen cinco ramitas (sus estambres) de color rojo intenso en forma de mano. Los aztecas utilizaban la flor y la llamaban Macpalxóchitl (flor de palma de mano). Tradicionalmente, esta vistosa flor se consume en infusiones para tratar úlceras crónicas, inflamación de los ojos, dolor de dientes, hemorroides o para controlar la presión, pero sobre todo para tratar afecciones del corazón, epilepsia, insomnio y como tranquilizante del sistema nervioso (Chanfón Küng, 2007).

Antes de la llegada de los españoles a territorio mexicano ya existía un gran conocimiento y uso de las plantas. Para la cultura azteca el mundo vegetal constituía una fuente importante de elementos que satisfacían sus actividades y creencias, como la alimentación, religión, medicina y otros (Zepeda-G *et al.*, 2008).

El interés por el estudio de las plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicamente activos se ha incrementado mundialmente. Esto se observa principalmente en países en desarrollo, donde las plantas son la fuente principal de medicamentos para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Alanís *et al.*, 2005). El mercado mundial de éstas, ya sea como materias primas o productos herbolarios presenta un crecimiento anual estimado del 5 al 15 %. El mercado global se calcula en 62 billones de dólares y se espera que crezca de 1 a 5 trillones de dólares para el año 2050 (Joshi *et al.*, 2004).

México tiene una gran herencia cultural en el uso de hierbas aromáticas y medicinales para tratar diferentes padecimientos (Juárez-Rosete *et al.*, 2013). Ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con megadiversidad biológica y posee cerca del 10 % del total de las especies conocidas, con un gran número de endemismos. En

el ámbito mundial, con respecto al número de especies de plantas, ocupa el quinto lugar, y se estiman en alrededor de 7,000 las especies con algún tipo de uso. Se han identificado y registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15 % de la flora total mundial); entre 3,500 a 4,000 son empleadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar; 370 se cultivan en el huerto familiar o de manera comercial; y 35 especies se encuentran amenazadas por factores externos. La validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en un 5 % de las especies; esto marca un campo de estudio importante. Sin embargo, se está dando una acelerada erosión genética de los recursos fitogenéticos en el mundo en especies cultivadas, sus formas silvestres y las especies silvestres afines como consecuencia de la sobreexplotación, los desplazamientos de cultivos y variedades tradicionales, la destrucción del hábitat natural y la pérdida del conocimiento asociado a estos recursos, entre otros factores. La tasa de extinción de recursos vegetales es de 100 a 1,000 veces más alta que las tasas naturales de desaparición (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010). Tal es el caso del ‘árbol de flor de manita’, catalogado como especie amenazada (aquella que se encuentra en peligro de desaparecer) por la norma NOM-059-SEMARNAT-2001.

La extinción de las especies es un proceso que depende de factores demográficos y genéticos. Aunque los factores demográficos son a veces de mayor importancia para determinar la viabilidad poblacional, las estrategias de conservación a largo plazo dependen del conocimiento de la estructura genética de la especie (Molina-Freaner *et al.*, 2001).

La biología molecular ha desarrollado métodos para la identificación y caracterización de cultivares mediante marcadores de ADN para los análisis genéticos, debido a su simplicidad y facilidad de manejo ayudan a la identificación de individuos en forma precisa e independiente del ambiente, y permiten determinar relaciones genéticas entre los mismos. Este tipo de marcadores se pueden evaluar desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, aplicables a cualquier tipo de material vegetal,

sin necesidad de evaluar muchos caracteres y además libres de los efectos epistáticos (Bautista-Puga *et al.*, 2011 y Alfaro-Rojas *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction) son herramientas eficientes, especialmente en estudios sobre la diversidad genética y el mapeo de genes. Se han desarrollado diferentes tecnologías de marcadores moleculares, incluyendo polimorfismos en ADN amplificados al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP); secuencia simple repetida o microsatélites (SSRs). Las principales limitaciones de estos métodos son: baja reproducibilidad de RAPD, costo elevado de AFLP y desarrollo de iniciadores específicos para SSRs (Bornet *et al.*, 2002 y Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Entre los métodos que generan marcadores dominantes de ADN multiloci, los ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas) han revelado un alto grado de polimorfismo generando información confiable para el análisis de ADN, debido a la reproducibilidad del método. Los ISSR permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Consisten en un motivo repetido de di - o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite (evitando los mononucleótidos que están presentes principalmente en los cloroplastos). En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas", asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente. Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que se detecta, así como en su reproducibilidad en la PCR. Asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los iniciadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida y son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos. Además, la técnica se caracteriza por poseer la sensibilidad necesaria para distinguir entre individuos genéticamente muy próximos (Pérez de la Torre *et al.*, 2010 y Chirinos-Arias *et al.*, 2015)

La variabilidad genética es la carga genética expresada o no de los individuos de una especie, donde su función es mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio que permita la adaptación y supervivencia de la especie. Cuando la estructura genética está fuertemente influenciada por la distribución geográfica de la poblaciones, se espera que las poblaciones más cercanas presenten menor variabilidad que las más alejadas geográficamente (Wen y Hsiao, 2001). El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética de tres poblaciones y un árbol de flor de manita utilizando marcadores moleculares (ISSR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes libres de daños físicos y plagas de tres poblaciones y un árbol (Cuadro 3.1). El número de individuos muestreados en cada población fue limitado debido a que existen ya muy pocos ejemplares de esta especie en su hábitat natural.

Cuadro 3.1 Poblaciones analizadas del árbol de ‘flor de manita’.

Localidad	Estado	Número de individuos	Edad aproximada
Carrizal de Bravo	Guerrero	11	Desconocida
Toluca	México	1 (El árbol histórico de la Ciudad)	265 años (Vázquez, 1991)
San Miguel Tlaixpan	México	7	125 años (Comunicación personal)
Chapingo	México	5	75 años (Vázquez, 1991)

Extracción y purificación de ADN genómico

Se utilizó el método reportado por Dellaporta *et al.* (1983), modificado. Se pesaron 0.3 g de material vegetal, se maceraron con nitrógeno líquido en mortero y una vez pulverizado el material se le adicionaron 600 µl de amortiguador de extracción (Tris-HCl

100 mM, EDTA- Na_2 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0), se mezclaron con agitación y se incubó a 65 °C por 10 minutos, en seguida se adicionaron 200 μL de acetato de potasio 5M y se dejó reposar 30 minutos en hielo. Después de este tiempo, se centrifugó a 15000 xg durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se le adicionaron 700 μL de isopropanol; se llevó a reposo a una temperatura de -20 °C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 10000 xg, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 200 μL de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 10 mM, pH 8.0) y 2 μL de ARNasa-A y se incubó a 37 °C por una hora, transcurrido el tiempo se adicionaron 20 μL de acetato de sodio 3M y 200 μL de isopropanol y se incubó a -20 °C durante dos horas, nuevamente se centrifugó a 10000 xg por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70 %, se dejó secar y se disolvió con 100 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8.0). El ADN obtenido se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Concentración y calidad de ADN

La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro GENESYS 10 UV-VIS de Thermo Scientific, el cual detecta la radiación emitida por las bases nitrogenadas presentes en el ADN luego de ser excitadas con luz de 260 nm. La calidad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Esta técnica se fundamenta en la migración de las moléculas de ADN, a través de una matriz gelatinosa, debida a la aplicación de un campo eléctrico. La detección visual del ADN se lleva a cabo utilizando una sustancia sensible a la luz ultravioleta, el bromuro de etidio. Este compuesto es un agente carcinogénico que actúa intercalándose dentro de la doble hélice del ADN (Rocha-Salavarieta, 2002). Las imágenes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290.

Amplificación ISSR-PCR

Se probaron 44 iniciadores ISSR de las series IAH, A, P, U, AG y DBD. Se seleccionaron aquellos que mostraron bandas nítidas y polimorfismo. Se utilizó PCR para detectar los polimorfismos dentro y entre las cuatro poblaciones evaluadas, la

reacción se llevó a cabo en un termociclador Techne TC-512. La mezcla de reacción incluyó los reactivos siguientes: 3.2 μL de agua estéril, 10 μL de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración 500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X, 2.0 μL de MgCl_2 25 mM, 3.0 μL de iniciador 10 pM $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 0.3 μL de Taq ADN polimerasa 5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 4.0 μL de ADN 10ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$; hasta un volumen final de 25 μL . La mezcla de la reacción se sometió a un ciclo inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C; 30 ciclos (incluyendo desnaturalización, alineamiento y extensión) de 1 minuto a 94 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C, concluyendo con un ciclo de extensión de 10 minutos a 72 °C. Los productos de la amplificación se visualizaron con un marcador de ADN (1 kb Ladder DNA Marker de GeneRulerTM) mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris acetato, pH 7.6; 1 mM Na_2EDTA), los cuales se tiñeron con bromuro de etidio. Las bandas amplificadas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta Kodak EDAS 290.

Análisis de datos

Los datos se capturaron en base a la presencia (1) o ausencia (0) de productos amplificados para cada iniciador, se excluyeron todas las bandas no reproducibles y se elaboró una matriz básica de datos (MBD), con ésta, se calculó una matriz de similitud mediante el coeficiente de Jaccard (1908) y se construyeron dendrogramas utilizando el análisis de conglomerados por el método de medias aritméticas (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages, UPGMA; Sneath y Sokal, 1973) empleando SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested clustering) con el software estadístico NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versión 2.21o (Applied Biostatistics) program (Rohlf, 2008).

La estimación de los parámetros de polimorfismos a nivel de poblaciones se analizó con el programa POPGENE versión 1.32 (© University of Alberta and Center for International Forestry Research) para marcadores dominantes. Los parámetros genéticos determinados fueron: porcentaje de loci polimórficos (P), número de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), índice de Shannon (I) y el índice de diversidad genética de Nei (H) (1973). También se calculó el coeficiente de

diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}), el número de individuos migrantes (N_m) y el índice de identidad genética de Nei.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Iniciadores ISSR para el análisis de poblaciones

La generación de datos utilizando ISSRs mostró ser conveniente para los estudios intraespecíficos de genética de poblaciones, aunque su utilidad no había sido evaluada en el 'árbol de flor de manita'. De un total de 44 iniciadores ISSR probados, se eligieron 20, los mismos que mostraron ser más nítidos y polimórficos (Cuadro 3.2). Los patrones de bandas obtenidos fueron nítidos (Figura 3.1).

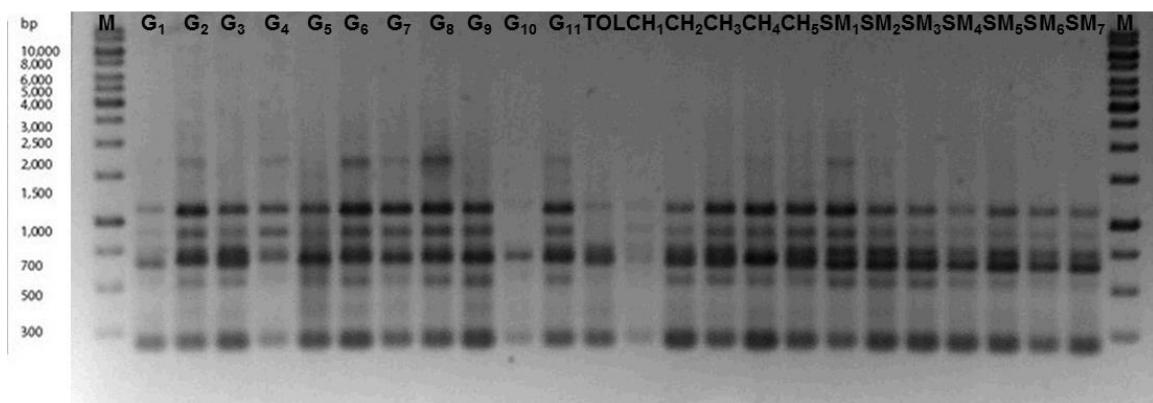


Figura 3.1. Patrones de bandas obtenidas con el iniciador ISSR5. M: marcador de peso molecular, bp (pares de bases), G_1 - G_{11} (individuos de la población de Guerrero), Tol (árbol de Toluca), CH_1 - CH_5 (individuos de la población de Chapingo) y SM_1 - SM_7 (individuos de la población de San Miguel Tlaixpan).

Amplificaron 129 bandas, mismas que dieron un porcentaje de polimorfismo de 52.41. El número de bandas amplificadas por iniciador se localizó en el rango de 3 para los iniciadores U815, (AG)8YA, U812 e ISSR3 a 11 para el iniciador IAH-01. El porcentaje de polimorfismo varió de 81.82 % a 20 % para los iniciadores IAH-01 e ISSR5, respectivamente.

Cuadro 3.2. Iniciadores ISSR utilizados en el presente estudio.

Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Número total de bandas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
IAH-01	ACACACACACACA	11	9	81.82
IAH-05	GAGGAGGAGGC	5	3	60.00
IAH-03	GAGAGAGAGAGACC	7	5	71.43
A2	CCGCCGCCGCCGCC G	10	5	50.00
A8	AGAGAGAGAGAGAGT	8	4	50.00
A10	GAGAGAGAGAGAGAGA	7	4	57.14
P2	CTGAGAGAGAGAGAGA G	7	2	28.57
P5	AGAGAGAGAGAGAGAG	10	6	60.00
U880	GGAGAGGAGAGGAGA	9	3	33.33
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGT	3	2	66.67
U812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	3	1	33.33
(AG)8YA	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	3	1	33.33
ISSR1	AGGAGGAGGAGGAGGAG G	6	2	33.33
(AG)8C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	5	2	40.00
DBD(AC)7	DBDACACACACACACAC	8	5	62.50
U809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	5	4	80.00
ISSR5	GAGAGAGAGAGAGAGAT	5	1	20.00
ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAC	4	2	50.00
U840	GAGAGAGAGAGAGAYT	10	7	70.00
U815	CTCTCTCTCTCTCTG	3	2	66.67
Total		129	70	52.41

Análisis de agrupamientos

El método de agrupamiento UPGMA generó un árbol de similitudes separando a las poblaciones y al árbol individual en 2 grupos a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.91 (Figura 3.2). El grupo I constituido por la población del Estado de Guerrero y las poblaciones de Chapingo y San Miguel Tlaixpan y el grupo II por el árbol de Toluca. Aunque el origen de los árboles de flor de manita del Estado de México se desconoce, Vázquez (1991) sugiere que el árbol de Toluca y los árboles de San Miguel Tlaixpan

probablemente proceden de los antiguos jardines botánicos de los Tenochcas, ubicados en Oaxtepec (Estado de Morelos) y Tezcotzingo (hoy Texcoco). Los árboles ubicados en la Universidad de Chapingo posiblemente fueron donados de San Miguel Tlaixpan (Comunicación personal), lo que justifica la alta similitud (0.93) de ambas poblaciones, también es posible que al encontrarse geográficamente cerca interactúan más debido al transporte de polen por el viento o con ayuda de polinizadores y, por lo tanto, comparten más información genética. En el mismo dendrograma se observa que las poblaciones de Chapingo y San Miguel Tlaixpan están genéticamente más relacionadas con la población de Guerrero y la población genéticamente más alejada fue Toluca.

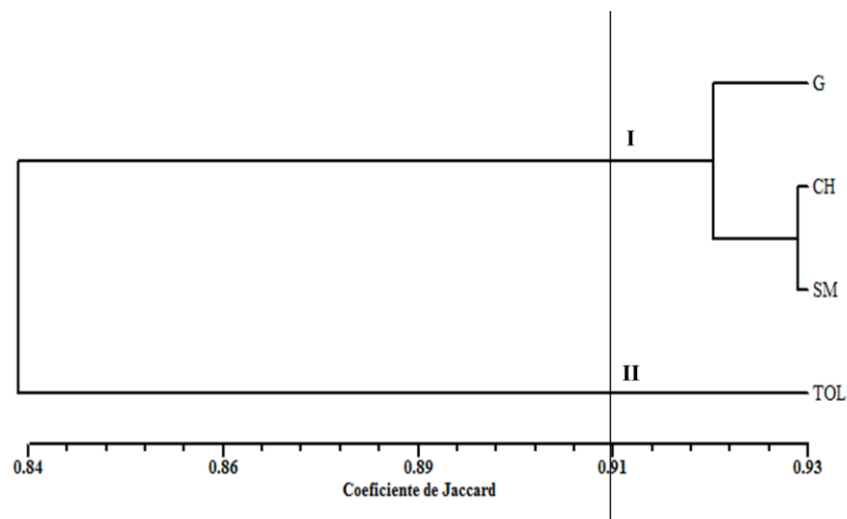


Figura 3.2. Dendrograma de relaciones entre las poblaciones y el árbol individual de ‘flor de manita’ utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA. G (Población de Carrizal de Bravo, Guerrero), CH (Población de Chapingo), SM (Población de San Miguel Tlaixpan) y TOL (el árbol de Toluca).

De manera similar al comportamiento de las poblaciones, el análisis del dendrograma para individuos dentro de las poblaciones los separa en cuatro grupos a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.80 (Figura 3.3). Los grupos I y II estuvieron constituidos por la mayoría de los individuos de la población de Guerrero. El grupo III se formó por tres subgrupos, el primero consistió de un individuo de Guerrero, el segundo se integró con individuos de Guerrero, Chapingo y San Miguel Tlaixpan y el tercero involucró individuos de Chapingo y San Miguel Tlaixpan. Finalmente, el cuarto grupo fue el árbol

de Toluca, que es el más alejado genéticamente. Estos datos sugieren que las poblaciones de Chapingo, San Miguel Tlaixpan y Guerrero están genéticamente muy relacionadas.

En ambos casos de agrupamiento (poblaciones e individuos) el árbol de Toluca aparece como un grupo independiente, posiblemente debido a que tiene un origen diferente, como lo mencionó Vázquez (1991). Las similitudes genéticas entre los individuos y entre las poblaciones son originadas por un antepasado común. Las poblaciones más similares poseen un mayor parentesco genético entre ellas, lo que significa que se han separado recientemente de su población antecesora común y si son muy diferentes sus líneas evolutivas se habrán separado hace mucho tiempo.

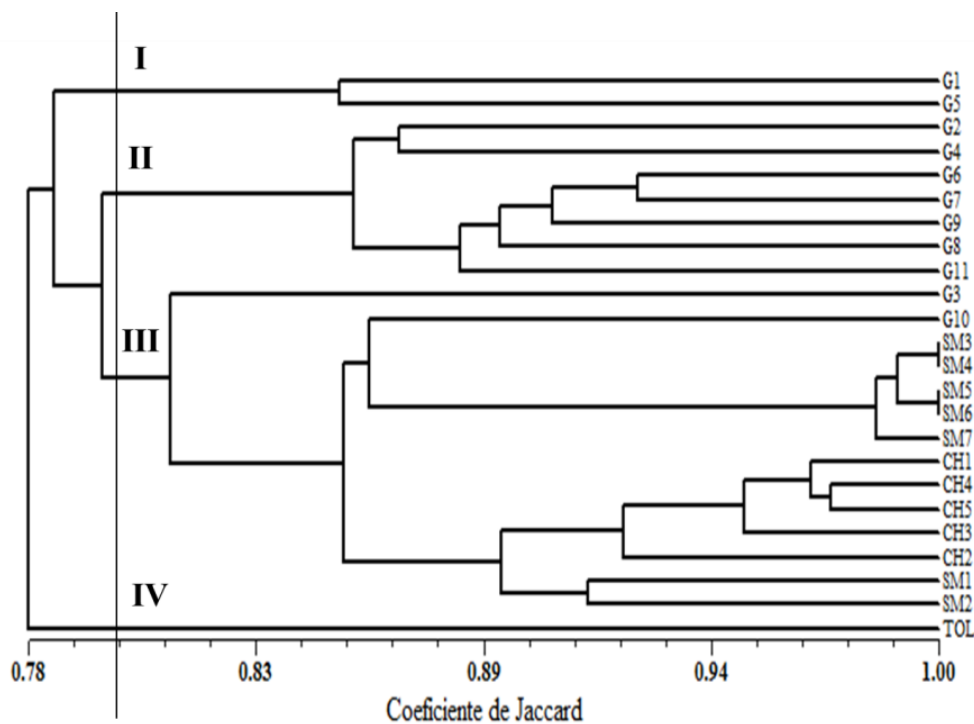


Figura 3.3. Dendrograma de relaciones entre individuos del 'árbol de flor de manita' obtenido utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA. G (Individuos de la población de Carrizal de Bravo, Guerrero), CH (Individuos de la población de Chapingo), SM (Individuos de la población de San Miguel Tlaixpan) y TOL (el árbol de Toluca).

Diversidad genética y diferenciación

La diversidad genética puede verse afectada de forma diferente por distintos procesos evolutivos, ecológicos o reproductivos de acuerdo a la actuación que estos tengan al nivel de las poblaciones. No obstante, la partición del total de la diversidad genética de una especie en sus componentes dentro y entre poblaciones nos permite conocer su organización en el espacio. La estructura genética dentro de poblaciones consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población. Existe una estructuración genética dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética entre poblaciones es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas (González-González, 2011).

Los resultados de la evaluación de la diversidad genética dentro de poblaciones se muestran en el Cuadro 3.3. Las poblaciones estudiadas presentaron valores de 1.0930 a 1.4496 para el número de alelos observados y de 1.0648 a 1.27 para el número efectivo de alelos, este último se refiere a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación (Kimura y Crow, 1964). Se detectaron los valores más altos de porcentaje de loci polimórficos y de diversidad genética (representada por los índices de Nei y Shannon) en la población de Guerrero, esto indica que los niveles mayores de diversidad en términos de polimorfismo se encuentran en esa región y que posee un alto potencial de diversidad molecular ya que el índice de Nei o la heterocigosidad esperada se considera la medida más consistente de diversidad genética porque incorpora tanto la diversidad alélica como la distribución de los alelos entre individuos (González-González, 2011). Caso contrario de las poblaciones de Chapingo y San Miguel Tlaixpan que presentan valores bajos de éstos parámetros. La población de Chapingo mostró el menor porcentaje de polimorfismo debido a que posiblemente se derivó de la población de San Miguel Tlaixpan y constituye una subpoblación de la misma, aunado a que la comunidad se encuentra conformada por pocos individuos y a la influencia de factores humanos y ambientales, generando una baja diversidad genética dentro de estas poblaciones.

Cuadro 3.3. Diversidad genética dentro de las poblaciones del árbol de ‘flor de manita’.

POBLACIÓN	Na	Ne	H	I	NLP	PLP
Guerrero						
Media	1.4496	1.27	0.1597	0.2394	58	44.96
Desviación estándar	0.4994	0.3533	0.1941	0.2814		
Chapingo						
Media	1.093	1.0648	0.0372	0.0546	12	9.3
Desviación estándar	0.2916	0.2147	0.1192	0.1731		
San Miguel Tlaixpan						
Media	1.1628	1.0881	0.0551	0.0841	21	16.28
Desviación estándar	0.3706	0.2196	0.1307	0.1961		

Na (número de alelos por locus), Ne (número efectivo de alelos), H (índice de diversidad de Nei), I (índice de información de Shannon), NLP (número de loci polimórficos) y PLP (porcentaje de loci polimórficos).

El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones (Cuadro 3.4) fue de 57.55 % ($G_{ST} = 0.5755$), lo que indica que el 57.55 % de la variación detectada se debe a diferencias entre las poblaciones, el resto (42.45 %) representa diversidad genética dentro de las poblaciones. Si el valor de G_{ST} es de 0 las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, no ha habido diferenciación genética entre las mismas y los individuos de las poblaciones comparten la mayoría de los genotipos encontrados. Para los marcadores dominantes G_{ST} muestra la proporción de la diversidad genética entre las poblaciones (Nei 1973). El valor de $G_{ST} = 0.5755$ determinado en la presente investigación sugiere que las poblaciones estudiadas están en proceso de diferenciación.

La tasa de movimiento de genes de una población a otra afecta de manera importante a las especies. La cantidad de flujo génico necesaria para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de las otras fuerzas evolutivas. Si Nm o el número de migrantes efectivos es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la

diferenciación local. Si N_m es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones (Piñero *et al.*, 2008). En función de G_{ST} se estimó el grado de flujo génico (N_m), con un valor de 0.3688, lo que significa que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que explica el alto grado de diferenciación.

Cuadro 3.4. Diversidad genética entre las poblaciones del árbol de ‘flor de manita’

	H_T	H_S	G_{ST}	N_m	NLP	PLP
Media	0.1484	0.063	0.5755	0.3688	64	49.61
Desviación estándar	0.0351	0.0075				

H_T (heterocigosidad en los loci polimórficos), H_S (heterocigosidad promedio), G_{ST} (coeficiente de diversidad genética entre poblaciones), N_m (número de individuos migrantes), NLP (número de loci polimórficos) y PLP (porcentaje de loci polimórficos).

El cálculo de distancias o identidades genéticas es muy útil para tener una idea general de que tan similares (o diferentes) son las poblaciones. En el Cuadro 3.5 se muestran los valores de identidad genética y de distancia genética de Nei (1987). La distancia genética es la cantidad de diferencias genéticas entre dos o más poblaciones o especies y ha sido formulada a partir de los siguientes supuestos: tasa de mutación constante e igual para todos los loci; poblaciones con tamaños efectivos iguales y constantes a través de las generaciones y que las poblaciones se encuentren en equilibrio mutación-deriva (Nei, 1972). La identidad genética mayor fue entre las poblaciones de San Miguel Tlaixpan y Chapingo, mientras que la menor fue entre Chapingo y Toluca, de acuerdo con estos resultados existe mayor relación genética entre las poblaciones geográficamente más cercanas (San Miguel Tlaixpan y Chapingo). Las distancias biológicas se ven afectadas fuertemente por la estructura de la población, es decir el equilibrio entre flujo y deriva genética, la distribución geográfica o el tamaño efectivo de la misma.

Cuadro 3.5. Medidas de identidad genética y distancia genética de Nei entre las poblaciones estudiadas.

<i>Población</i>	Guerrero	Toluca	Chapingo	San Miguel Tlaixpan
Guerrero	****	0.8418	0.9265	0.9117
Toluca	0.1722	****	0.8295	0.8453
Chapingo	0.0763	0.1869	****	0.9288
San Miguel Tlaixpan	0.0924	0.1681	0.0738	****

Identidad genética de Nei (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal).

CONCLUSIONES

Las poblaciones del ‘árbol de flor de manita’ genéticamente más relacionadas fueron las de Chapingo y San Miguel Tlaixpan, mientras que la más alejada fue la de Toluca. La población de Chapingo mostró bajos valores de diversidad genética y la de Guerrero fue la que presentó los valores más altos de diversidad. Las poblaciones están en proceso de diferenciación debido al bajo nivel de flujo génico que existe entre las mismas. La diversidad genética de la población fue muy baja, de ahí que se le pueda considerar como una especie amenazada y en posible riesgo de extinción.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la M en C. María Edith Cruz Maya por las sugerencias a este estudio y a la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández por su ayuda en la realización del muestreo de la población de Carrizal de Bravo en el Estado de Guerrero.

BIBLIOGRAFÍA

Alanís A.D., F. Calzada, J. A. Cervantes, J. Torres and G. M. Ceballos (2005) Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100:153–157.

Alfaro-Rojas G., J. P. Legaria-Solano y J. E. Rodríguez-Pérez (2007) Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave spp*) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(1):1-12.

Bautista-Puga M. D., L. M. Vázquez-García, H. Leszczynska-Borys, M. W. Borys y A. M. Arzate-Fernández (2011) Caracterización del lirio azteca mediante marcadores morfológicos y moleculares. *Agrociencia* 45:413-422.

Bornet B., F. Goraguer, G. Joly and M. Branchard (2002) Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45:481-484.

Chanfón Küng. S (2007) Flor de manita: Una “manita” para el corazón y los nervios. *CONABIO. Biodiversitas* 74:13-15.

Chirinos-Arias M. C., J. E. Jiménez y M. S. Vilca-Machaca (2015) Análisis de la variabilidad genética entre treinta accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) usando marcadores moleculares ISSR. *Scientia Agropecuaria* 6(1):17-30.

Comunicación Personal. Sr. Margarito Cruz Segura. Propietario de los árboles muestreados en San Miguel Tlaixpan Texcoco, Estado de México y proveedor de flor de manita del Mercado de Sonora (Ciudad de México).

Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 4(1):19-21.

González-González E. A (2011) Tesis Doctoral. Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae).

Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 268 p.

Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles 44:223-70.

Joshi K., P. Chavan, W. Dnyaneshwar and B. Patwardhan (2004) Molecular markers in herbal drug technology. Current Science 87(2):159-165.

Juárez-Rosete C. R., J. A. Aguilar-Castillo, M. E. Juárez-Rosete, R. Bugarín-Montoya, P. Juárez-López, y E. Cruz-Crespo (2013) Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación. Biociencias 2(3):119-129.

Kimura M. and J. F. Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49:725-738.

Molina-Freaner F, P. Delgado, D. Piñero, N. Perez-Nasser and E. Alvarez-Buylla (2001) Do rare pines need different conservation strategies? Evidence from three Mexican species. Canadian Journal of Botany 79:131–138.

Nei M (1972) Genetic distance between populations. American Naturalist 106:283-292.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70:3321-3323.

Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Disponible en línea.

Consultado en Junio del 2014. www.biodiversidad.gob.mx/pdf/NOM-059-ECOL-2001.pdf

Pérez De la Torre M., P. Zirilli, N. Ulrich, L. Setten y A. Escandón (2010) Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav. (*Plantaginaceae*) utilizando marcadores ISSR. *Revista de la Facultad de Agronomía* 109 (1):23-29.

Piñero D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha-Olivares y R. Salas-Lizana (2008) La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital Natural de México*, Vol. 1. Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp:415-432.

Pradeep Reddy M., N. Sarla and E. A. Siddiq (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.

Rocha-Salavarrieta P.J (2002) Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas* 23(3):9-17.

Rohlf F. J (2008) NTSYSpc: *Numerical Taxonomy System*. ver. 2.21o. Exeter Publishing, Setauket, New York. 44 p.

Schlaepfer L. y J. A. Mendoza-Espinoza (2010) Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(4):18-27.

Sneath P. H. y R. R. Sokal (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. H. Freeman & Co. San Francisco, Cal. USA. 573 p.

Vázquez L. M (1991) El árbol de las manitas en México. Universidad Autónoma del Estado de México UAEM. Estado de México, México. 59 p.

Wen C. S and J. Y. Hsiao (2001) Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan Lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. International Journal of Plant Sciences 162(2):287-295.

Zepeda-G. C. y L. White-O (2008) Herbolaria y pintura mural: plantas medicinales en los murales del convento del divino salvador de Malinalco, Estado de México. Polibotánica 25: 173-199.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Se caracterizó fitoquímicamente la 'flor de manita' obteniéndose metabolitos secundarios como el β -sitosterol y la sacarosa.
2. Se produjeron callos *in vitro* en los que se encontró la presencia de β -sitosterol.
3. Se utilizaron marcadores moleculares ISSR con los que se encontró que la diversidad genética de las poblaciones fue muy baja, de ahí que se le pueda considerar como una especie amenazada y en posible riesgo de extinción.

Con esta investigación se contribuye al conocimiento de la 'flor de manita' en forma interdisciplinaria, para fortalecer la riqueza etnobotánica de nuestro país y proteger las especies endémicas.